

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra Antropologie a genetiky člověka**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Tereza Červená**

**Analýza DNA v rodokmenových studiích a při určování vzdálenější genetické příbuznosti**

**The use of DNA analysis in kinship studies and investigation of distant biological relationship of people**

**Bakalářská práce**

Vedoucí závěrečné práce

**Mgr. Halina Šimková**

Praha, 2014



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Čerčanech, 14. 5. 2014

.....

Tereza Červená

### **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí práce paní Mgr. Halině Šimkové, která si i přes svoji pracovní vytíženost našla čas a chuť mi pomoci při tvorbě této práce. Bez jejích cenných rad, připomínek a korektur by tato práce nevznikla v podobě, v jaké ji předkládám.

Dík také patří mé rodině, milovaným a přátelům, kteří mi byli oporou a přinášeli podnětné připomínky.

## **Abstrakt ČJ**

Práce se věnuje možnostem a problematice DNA analýzy při jejím využití v rodokmenových studiích a při určování vzdálenější genetické příbuznosti osob. Představuje přehled využitelných DNA markerů se zaměřením na propojení autozomálních a liniových markerů – mtDNA a Y-STR; charakterizuje typické vzorce předávání jednotlivých typů markerů a vysvětluje základní principy interpretace jejich analýzy. Práce se dále věnuje softwarům využívaným při statistických výpočtech a v závěrečné části jsou obsaženy kazuistiky; konkrétní příklady využití DNA analýzy pro účely rodokmenových studií a genetické příbuznosti osob.

### **Klíčová slova**

DNA analýza, genealogie, rodokmenová studie, STR, SNP, DNA marker

## **Abstrakt AJ**

The thesis deals with the possibilities and problems of DNA analysis in its use in kinship studies and investigation of distant biological relationship of people. It presents a summary of useful DNA markers with a focus on linking autosomal markers and lineage markers - mtDNA and Y-STR; characterizes the typical heredity of individual types of markers and explains the basic principles of interpretation of their analysis. The research also deals with computer software exploited in statistical calculations; case studies, specific examples of the use of DNA analysis in kinship studies and investigation of distant biological relationship of people are also included at the final section.

### **Key words**

DNA analysis, genealogy, kinship study, STR, SNP, DNA marker

## Obsah

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Úvod.....   | 1  |
| 2     | Příbuznost u člověka .....                                    | 2  |
| 2.1   | Aspekty příbuznosti u člověka .....                           | 2  |
| 2.1.1 | Rodina.....   | 2  |
| 2.1.2 | Rod .....   | 2  |
| 2.2   | Biologická vs. formální příbuznost .....                      | 3  |
| 2.2.1 | Biologická příbuznost.....                                    | 3  |
| 2.2.2 | Formální příbuznost.....                                      | 4  |
| 2.2.3 | Nesoulad mezi biologickou a formální příbuzností.....         | 4  |
| 2.3   | Předávání DNA markerů a genetická výbava jedince .....        | 5  |
| 2.3.1 | Standardní situace vzniku jedince .....                       | 5  |
| 2.3.2 | Dědičnost .....   | 5  |
| 2.3.3 | Nestandardní situace vzniku jedince .....                     | 6  |
| 2.4   | Genealogie.....   | 7  |
| 3     | Forenzní DNA markery.....                                     | 7  |
| 3.1   | Charakteristika forenzních DNA markerů.....                   | 8  |
| 3.2   | Typy DNA markerů.....   | 8  |
| 3.2.1 | Minisatelity, VNTR .....                                      | 8  |
| 3.2.2 | Mikrosatelity, STR .....                                      | 9  |
| 3.2.3 | SNP markery.....  | 9  |
| 3.2.4 | Hypervariabilní oblasti mtDNA .....                           | 10 |
| 3.3   | Liniové markery .....   | 11 |
| 3.3.1 | MtDNA.....  | 11 |
| 3.3.2 | Chromozom Y .....   | 12 |
| 3.3.3 | Chromozom X .....   | 13 |
| 4     | Metodika a analýza DNA.....                                   | 13 |
| 4.1   | RFLP (restriction fragment length polymorphism) .....         | 13 |
| 4.2   | AmpFLP (amplified fragment length polymorphism).....          | 14 |
| 4.3   | Analýza STR (short tandem repeats).....                       | 14 |
| 4.4   | Analýza SNP (single nukleotide polymorphism) .....            | 15 |
| 4.4.1 | Sangerova metoda sekvenace .....                              | 15 |
| 4.4.2 | Metody využívající DNA hybridizace.....                       | 15 |
| 4.4.3 | Metody využívající Primer extension .....                     | 16 |
| 4.4.4 | Metody využívající DNA ligázu.....                            | 16 |
| 4.4.5 | Metoda Invader.....   | 16 |
| 5     | Hodnocení příbuznosti dle DNA.....                            | 17 |
| 5.1   | Pravděpodobnost .....   | 17 |
| 5.1.1 | První zákon pravděpodobnosti .....                            | 17 |
| 5.1.2 | Druhý zákon pravděpodobnosti o sčítání pravděpodobností ..... | 18 |
| 5.1.3 | Třetí zákon pravděpodobnosti o násobení pravděpodobností..... | 18 |
| 5.2   | Šance .....   | 18 |
| 5.3   | Hardy-Weinbergův zákon o alelách .....                        | 18 |
| 5.4   | Bayesova věta.....  | 18 |
| 5.4.1 | Hypotézy při analýze příbuznosti .....                        | 19 |
| 5.4.2 | Apriorní pravděpodobnost a šance .....                        | 19 |
| 5.4.3 | Věrohodnostní poměr LR .....                                  | 19 |
| 5.4.4 | Aposteriorní pravděpodobnost a šance .....                    | 20 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 5.5 | Interpretace analýzy autozomálních lokusů .....                           | 20 |
| 5.6 | Interpretace analýzy liniových markerů .....                              | 21 |
| 6   | Propojení DNA analýzy a rodokmenových studií.....                         | 22 |
| 6.1 | Genealogické a DNA profilovací softwaru .....                             | 22 |
| 6.2 | Praktické použití forenzních softwarů.....                                | 22 |
| 7   | Kazuistika.....   | 23 |
| 7.1 | Identifikace ostatků cara Mikuláše II. a jeho rodiny .....                | 23 |
| 7.2 | Ötzi, Tyrolská ledová mumie .....   | 24 |
| 7.3 | Y-chromozomová analýza kostních ostatků Jörga Jenatsche (1596–1639) ..... | 24 |
| 7.4 | Rekonstrukce rodokmenu v údolí Val Borbera.....                           | 25 |
| 7.5 | Rekonstrukce rodokmenu Řádu Amišů v Pensylvánii, USA .....                | 25 |
| 7.6 | Rekonstrukce rodokmenu 18. dynastie faraónů (1550-1295 př. l.).....       | 25 |
| 7.7 | Král Richard III. a jeho kontroverzní hrob.....                           | 26 |
| 7.8 | Určení ostatků obětí teroristického útoku z 11. 9. 2001, New York .....   | 27 |
| 8   | Závěr .....   | 27 |
| 9   | Seznam literatury .....   | 29 |
|     | Internetové zdroje .....  | 35 |
| 10  | Příloha .....   | 36 |

## Seznam zkratk

|            |  |
|------------|--|
| DNA        | Deoxyribonukleová kyselina             |
| WGA        | Wide genome analysis                   |
| A, C, G, T | Adenosin, cytosin, guanin thymin       |
| AIMs       | Ancestry informative markers           |
| AmpFLP     | Amplified fragment length polymorphism |
| APEX       | Arrayed primer extension               |
| CODIS      | Combined dna index system              |
| CRI        | Combined relationship index            |
| DASH       | Dynamic allele-specific hybridization  |
| E, I       | Genetický důkaz, negenetický důkaz     |
| ESS        | The European standard set              |
| FEN        | Flap endonuclease                      |
| FP         | Fluorescence polarization              |
| FRET       | Fluorescence resonance energy transfer |
| H          | Heritabilita                           |
| Hae III.   | Restrikční endonukleáza Hae III.       |
| HVR        | Hypervariable regions                  |
| HWE        | Hardy-Weinberg equilibrium             |

|                   |   |
|-------------------|---|
| I.U.I             | Intrauterinní inseminace                      |
| IBD               | Identity by descent                           |
| IBS               | Identity by state                             |
| IVF               | In vitro fertilization                        |
| $K$               | Koeficient příbuznosti                        |
| $K_{DZ}$          | Konkordance znaku u monozygotních dvojčat     |
| $K_{MZ}$          | Konkordance znaku u dizygotních dvojčat       |
| LR                | Likelihood ratio                              |
| MALDI-TOF MS      | Matrix-assisted laser desorption/ionization   |
| MCMC              | Markov chain Monte Carlo                      |
| MRCA              | Most recent common ancestor                   |
| mtDNA             | Mitochondriální DNA                           |
| nDNA              | Nukleární DNA                                 |
| NRY               | Non-recombining region of the Y chromosome    |
| $O$               | Šance   |
| oriH              | Replikační počátek mtDNA                      |
| p                 | Krátké chromozomové raménko                   |
| $P$               | Pravděpodobnost                               |
| PCR               | Polymerase chain reaction                     |
| PI                | Paternity index                               |
| $Pr$              | Apriorní šance/pravděpodobnost                |
| Q                 | Velké chromozomové raménko                    |
| R                 | Coefficient of relatedness                    |
| rCRS              | Revidovaná cambridgeská sekvence              |
| RFLP              | Restriction fragment lenght polymorphism      |
| SGM plus          | Second generation multiplex plus              |
| SISAR             | Serial invasive signal amplification reaction |
| SNP               | Single nucleotide polymorphism                |
| STR               | Short tandem repeats                          |
| TDG               | G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase |
| VNTR              | Variable number of tandem repeats             |
| Y-SNP             | SNP markery chromozomu y                      |
| Y-STR             | STR markery chromozomu y                      |
| $\theta (F_{ST})$ | Koeficient imbreedingu                        |



# 1 Úvod

Využití DNA analýzy pro potřeby genealogie a určování vzdálenější příbuznosti osob je oblastí DNA analýzy, která se výrazně rozvíjí především v posledních letech, přestože už i ve svých počátcích v 90. letech přinášela významné výsledky.

Tyto postupy se uplatňují jak u zkoumání identity a příbuznosti historických osob, tak současných příbuzenských vazeb, a jsou často zdrojem cenných informací v rámci komplexních, multidisciplinárních analýz. Jejím významným potenciálem je schopnost vnášet nové důkazy a teorie do zkoumání, podporovat či vyvracet hypotézy o příbuznosti, a napomoci tak historikům, antropologům či právnímu systému rozřešit daný problém. Tyto její vlastnosti jsou zřetelné v konkrétních kazuistikách, kde bychom bez analýzy DNA nebyli schopni na základě ostatních dostupných dat určit nejpravděpodobnější hypotézu.

Nově vznikající metody analýzy DNA, které jsou stále rychlejší a cenově dostupnější, takže mohou být aplikovány v mnohem větší šíři, než tomu bylo dříve, mají značný potenciál uplatnit se jak v rodokmenových analýzách, identifikaci starých kosterních ostatků, tak i ve studiích zkoumajících evoluci lidstva.

Nejnovější metody celogenomových analýz WGA (angl. *Wide genome analysis*) budou podobně jako dřívější metody s největší pravděpodobností značně rozšiřovat potenciál využití DNA analýzy.

Cílem této práce je podat stručný a ucelený náhled do problematiky příbuzenských vztahů a využití analýzy DNA pro účely jejich testování. Práce se věnuje forenzním markerům a interpretaci výsledků, která je jednou z nejpodstatnějších částí při genealogických a identifikačních zkoumáních; přináší též příklady konkrétního využití v již zmíněných kazuistikách.

## 2 Příbuznost u člověka

### 2.1 Aspekty příbuznosti u člověka

Termínem *příbuznost* obecně označujeme určitou blízkost, podobnost či společný původ dvou objektů. Příbuzností u člověka můžeme rozumět jednak čistě příbuznost biologickou, tedy genetickou, o níž blíže pojednává kapitola 2.2, jednak obecněji příbuznost v antropologickém pojetí, tedy příbuznost formální, sociální, kulturní, která může a nemusí být odvozena od příbuznosti biologické. V historickém kontextu se studiem příbuznosti, rodových vztahů jednotlivých osob, jakožto i obecnými aspekty a proměnami těchto vztahů zabývá obor genealogie neboli rodopis. V genetickém kontextu se studiu těchto vazeb věnuje forenzní genetika, v širším měřítku pak populační genetika.

#### 2.1.1 Rodina

Výklad pojmu *rodina* se v průběhu historie značně měnil a také význam rodiny jako společenské jednotky nebyl vždy stejný. V období před 18. stoletím se za rodinu považovali pokrevně příbuzní jedinci, manželstvím spjatí jedinci a čeleď žijící v jednom domě. V období industrializace se pojem rodina zúžil pouze na pokrevní příbuzné, manželstvím sezdané osoby a adoptované jedince (Parsons et al, 1955). Dnes definujeme rodinu jako skupinu pokrevně, manželstvím či adopcí spjatých osob, které vychovávají své potomky, starají se o předky a fungují jako sociální a ekonomická jednotka státu (Scott et al, 2007).

Pro popis jednotlivých příbuzenských vztahů jsou užívána ustálená označení (v češtině např. *matka*, *otec*, *dcera*, *bratr*, *strýc* atd.). Jejich přesný význam není však geograficky zcela uniformní a i v průběhu staletí se měnil, proto je při studiu příbuznosti vždy třeba brát ohled na daný historicko-geografický kontext. Jako příklad lze užít termín *strýc*, v dnešním kontextu chápaný jako „mužský sourozenec jednoho z rodičů či manžel sestry jednoho z rodičů“. V minulosti byl tento termín ovšem vyhrazen pouze pro označení otcova bratra (matčin bratr byl označován jako *ujec*, muž otcovy sestry *tetec* a muž matčiny sestry *posel*), (Lutonský, 2003).

#### 2.1.2 Rod

*Rod* neboli *dynastie* je termín nadřazený rodině a historicky je nejčastěji spojován s významnými, sociálně vysoko postavenými rodinami, například šlechtici<sup>1</sup>. Obecně za rod pokládáme skupinu biologicky a formálně spřízněných osob odvozujících svůj původ od společného předka. Na rozdíl od rodiny se rodová příbuznost v evropské civilizaci v historii sledovala pouze po paternální linii<sup>2</sup>, přičemž pokud se žena provdala, automaticky se stávala členkou rodu svého manžela. Základním znakem rodu je doložitelný rodokmen s údaji o všech mužích, jejich manželkách a potomcích. Nejstarším doloženým rodem je japonská císařská dynastie Jamato, vládoucí již od roku 660 př. n. l. (Imperial Household Agency, 2011).

<sup>1</sup> Příkladem může být Windsorská dynastie či Habsburkové, více např. na <http://en.wikipedia.org/wiki/Dynasty>.

<sup>2</sup> Paternální vnímání rodovosti je v lidských společenstvích obecně běžnější, existují ovšem i maternálně vnímané rodové linie, ale jsou velmi vzácné. Např. „Modjadji“, Královna deště v Jižní Africe.

## 2.2 Biologická vs. formální příbuznost

### 2.2.1 Biologická příbuznost

Základním předpokladem při testování biologické příbuznosti je fakt, že pro každou rodinu (geneticky spřízněné osoby) existuje skupina znaků, které se predikovatelně předávají z generace na generaci. Míra zastoupení těchto znaků mezi dvěma jedinci určuje jejich biologickou vzdálenost a tím úroveň biologické příbuznosti (Wenk, et al. 1996).

Úroveň biologické příbuznosti a potenciální množství společných znaků (alel či mutací) se určuje pomocí **koeficientu příbuznosti  $r$**  (angl. *Coefficient of relatedness*).

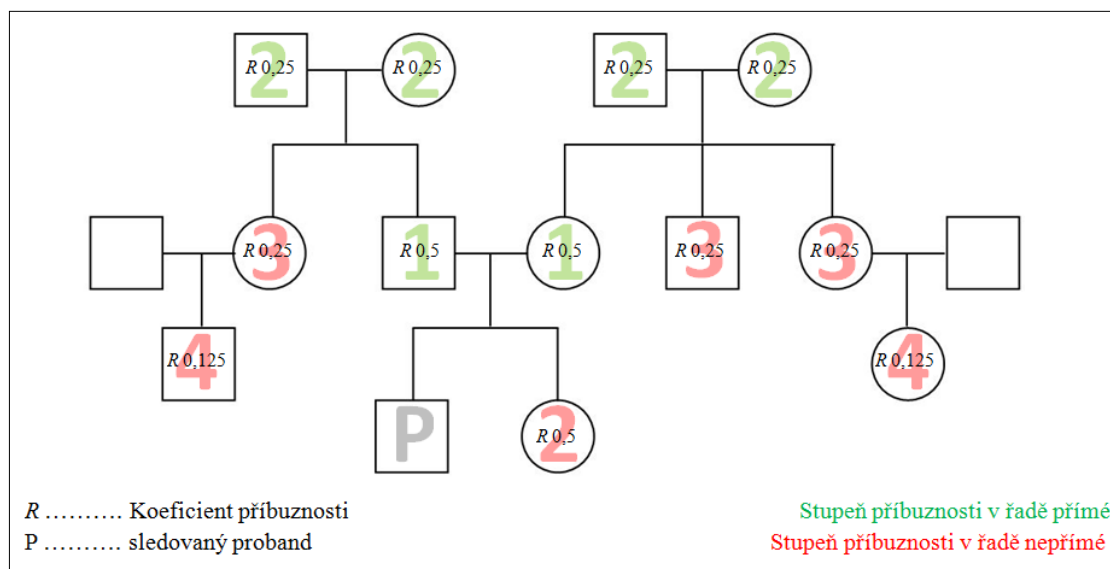
Koeficient příbuznosti  $r$  udává, jaká je pravděpodobnost, že dvě osoby v daném příbuzenském vztahu zdědily určitou alelu určitého DNA lokusu od téhož společného předka; současně tak tento koeficient vyjadřuje, jaký je předpokládaný podíl genetického materiálu sdíleného mezi těmito jedinci v důsledku zdědění od společného předka. Koeficient lze obecně stanovit jako

$$r = \left(\frac{1}{2}\right)^n,$$

kde  $n$  je počet generací mezi danými jedinci. Rodič a potomek mají  $r = 0,5$ , bratranec či sestřenice 1. řádu mají  $r = 0,125$  atd.

Dalším z pojmů charakterizující příbuznost je tzv. **stupeň příbuznosti**. Stupeň příbuznosti v řadě přímé určuje míru příbuznosti předků a jejich potomků. Druhým typem je stupeň příbuznosti v řadě nepřímé, kde se stupeň příbuznosti určuje ke společnému předku (Zákon č. 40/1964 Sb., občanský zákoník, § 117).

Běžně používanou škálou příbuznosti je rozdělení stupňů podle koeficientu  $r$ . V důsledku to znamená, že pro 1. stupeň příbuznosti platí  $r = 0,5$ , pro 2. stupeň  $r = 0,25$ , pro 3. stupeň  $r = 0,125$  atd., viz Obr. č. 1 (Šimková, 2012).



Obr. č. 1, Koeficient příbuznosti a stupeň příbuznosti v řadě přímé i nepřímé

### 2.2.2 Formální příbuznost

Kromě biologické příbuznosti rozlišujeme i *příbuznost formální*, tedy právně vymezenou. V České republice je formální příbuznost upravena Zákonem o rodině (94/1963 Sb.) a je evidována na matrikách. Příkladem čistě formální příbuznosti je akt osvojení dítěte manželem při uzavření sňatku se ženou, která má toto dítě s předchozím partnerem. Za příklad formální příbuznosti můžeme považovat i vztah synovec/neteř – teta/strýc mezi osobou a manželem/kou sourozence jednoho z jejích rodičů, kde z biologického hlediska jde o nepříbuznou osobu a příbuznost je zde čistě sociální a kulturní.

### 2.2.3 Nesoulad mezi biologickou a formální příbuzností

K nesouladu mezi biologickou a formální příbuzností může docházet buď vědomě, jak již bylo naznačeno v předchozí části, nebo se jedná o případy, kdy buď jeden či oba aktéři o nesouladu neví. O vědomém nesouladu mluvíme například v případě adopcí a dárcovství pohlavních buněk, o nevědomém pokud se jedná o nonpaternitu<sup>3</sup> či kupříkladu záměnu dětí v porodnici, záměnu pohlavních buněk IVF v laboratoři apod.

*Nonpaternita* je stav, kdy formální otec není otcem biologickým, nicméně se tak domnívá. Potvrzení či vyloučení biologického otcovství představuje jednoznačně největší podíl analýz příbuznosti ve forenzní genetice. K testování paternity dochází buď na základě soukromé žádosti, nebo je test soudně nařízen v rámci soudního jednání jako důkazní materiál (v ČR bylo takových případů v roce 2011 celkem 2433 (Statistický přehled soudních agend, 2011)).

Méně obvyklým příkladem nesouladu biologické a formální příbuznosti je záměna dětí v porodnici. V roce 2006 byla na Třebíčsku potvrzena záměna dvou dívek, přičemž podnětem k vyšetřování byla žádost rodičů, již předcházela paternitní test provedený na základě pochybnosti jednoho z otců. V minulosti nebylo takovéto záměny možné nijak prošetřit, ale některé byly později potvrzeny zpětně testem DNA (Giammarco, 2012).

Adopce je speciálním případem, kdy biologická příbuznost nekoreluje s formální. Osvojeno může být jak dítě, tak dospělý jedinec. V současnosti je adopce pod dohledem státu a spadá jak pod zákony státu (Zákon č. 94/1963 Sb., Zákon č. 359/1999 Sb.), tak pod mezinárodní úmluvy (Úmluva o ochraně dětí a spolupráci při mezinárodním osvojení (1993), Úmluva Organizace spojených národů o právech dítěte (1989), Evropská úmluva o adopci dětí (1967)).

Se zvyšující se neplodností párů se čím dál více využívá metod asistované reprodukce<sup>4</sup>. Při výkonech, jako je IVF nebo I. U. I.<sup>5</sup>, může lékař použít jak pohlavní buňky partnera/ky, tak i anonymního dárce či dárkyně. Při využití buněk anonymního dárce je jedinec po formální stránce přímým potomkem rodičů, ale z biologického hlediska je míra příbuznosti variabilní. V případě, že pár použije pouze dárcovské spermie či vajíčka, je potomkův koeficient  $r = 0,5$  vůči tomu z rodičů, jehož pohlavní buňky byly použity.

<sup>3</sup> *Nonpaternita*, z anglického slova *nonpaternity*, významem se jedná o antonymum slova *otcovství*.

<sup>4</sup> Ústav pro péči o matku dítě v Podolí provedl v roce 2013 na 1049 výkonů asistované reprodukce (Výroční zpráva IVF ÚPMD 2013).

<sup>5</sup> Komplexní přehled metod asistované reprodukce např. na stránkách <http://www.fertimed.cz/metody-asistovane-reprodukce/>

Pokud pár přijme oba typy pohlavních buněk či již oplodněné embryo darované jiným párem, je potomkův  $r$  k formálním rodičům roven koeficientu imbreedingu dané populace<sup>6</sup>.

## 2.3 Předávání DNA markerů a genetická výbava jedince

Biologickou příbuznost osob lze nejspolehlivěji určit DNA analýzou vzorků vyšetřovaných osob či jejich blízkých příbuzných. To, jaké markery k analýze zvolíme, záleží na testované hypotéze. Principy předávání DNA markerů (viz kapitola 3) se liší podle umístění těchto markerů v rámci genomu. V případě nDNA existují charakteristické rodokmenové vzorce předávání autozomálních markerů, markerů X-chromozomálně vázaných a markerů Y-chromozomálně vázaných. MtDNA markery vykazují striktně maternální dědičnost a jsou často jediným použitelným vzorkem DNA u starých pozůstatků (Stone, et al., 2001).

### 2.3.1 Standardní situace vzniku jedince

Oplození a vzniku zygoty předchází meiotické dělení oocyty a spermatocyty za vzniku pohlavních buněk – vajíček a spermií. Při tomto procesu dochází k rozdělení mateřského i otcovského genetického materiálu na polovinu, ke snížení ploidie a je tak zajištěno, že potomek dostane  $\frac{1}{2}$  autozomálních alel od otce a  $\frac{1}{2}$  od matky při zachování diploidní sady chromozomů. Dalším mechanismem, který dramaticky zvyšuje kombinační variabilitu pohlavních buněk, je crossing-over, ke kterému dochází v průběhu meiózy, konkrétněji v profázi 1. meiotického dělení, kdy si homologní otcovské a mateřské chromozomy vymění své části. Pro dva sledované heterozygotní DNA lokusy, ležící na téže chromozomu, tak z jednoho oocyty či spermatocyty mohou vzniknout 4 typy haploidních buněk s různou alelickou kombinací (Goodwin et al., 2007). Při následném oplození a vzniku zygoty je zpravidla polovina chromozomů od otce a polovina od matky.<sup>7</sup>

MtDNA se s 100% pravděpodobností dědí maternálně a s téměř 0 % pravděpodobností od otce, protože paternální mtDNA je aktivně likvidována (Schwartz a Vissing, 2002).

### 2.3.2 Dědičnost

Základem pro studium dědičnosti a určení vzorce předávání znaku je genealogický strom podpořený DNA analýzou. Každý znak jedince je dán jak genotypem, tak vlivem prostředí, ve kterém jedinec žije. Míru dědičnosti daného znaku určuje heritabilita  $H$ , která vychází ze studií prováděných na dizygotních a monozygotních dvojčatech (Merriman, 1924).  $H$  je tím vyšší, pokud platí  $K_{DZ} > K_{MZ}$ .

$$H = \frac{K_{MZ} - K_{DZ}}{100\% - K_{DZ}},$$

kde  $H$  je heritabilita,  $K_{MZ}$  je konkordance znaku u monozygotních a  $K_{DZ}$  konkordance znaku u dizygotních dvojčat. Při určování genetické příbuznosti osob se využívá obdobného principu, jen nesledujeme fenotypový znak, ale DNA markery na autozomech, gonozomech nebo v mtDNA. Pro X-

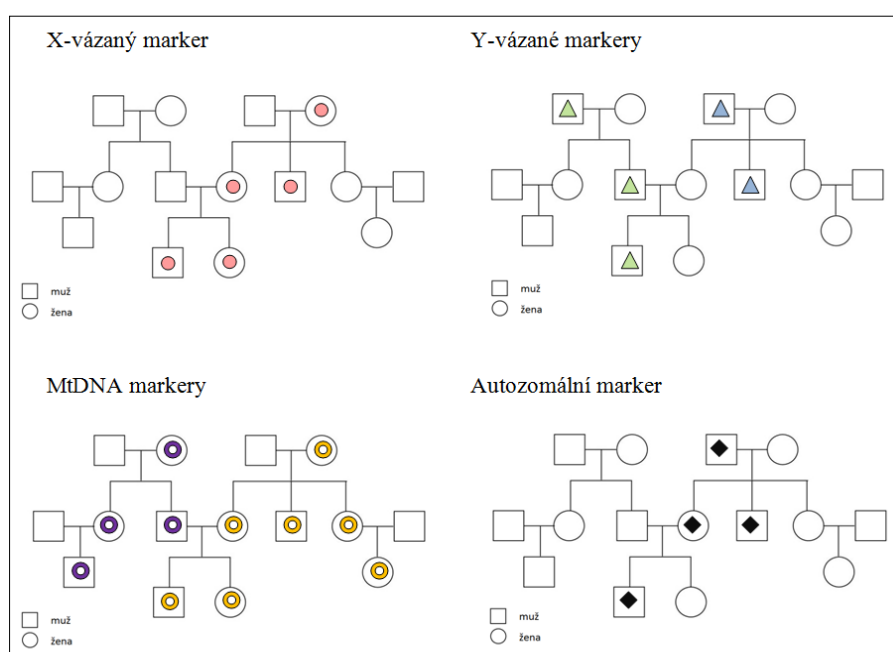
<sup>6</sup> Viz kapitola 5.5.

<sup>7</sup> Výjimkou je situace, kdy dojde vlivem vnějších či vnitřních faktorů k nerovnoměrnému rozdělení chromozomů při meióze (Griffin, et al., 1995; Boselli, et al., 2009).

vázané markery a autozomální markery platí, že muž i žena je do další generace předají s přibližně 50% pravděpodobností. Y-vázané markery se vždy předají z otce na syna a mtDNA markery se z matky přenesou na všechny její potomky, přičemž syn tvoří terminální článek linie (Goodwin et al., 2007).

Vzorci předávání DNA markerů na příkladech rodokmenu ukazuje Obrázek č. 2.

Při určování dědičnosti daného markeru a následných pravděpodobnostních výpočtech nemusejí závěry podporovat žádnou z jednoduchých testovaných hypotéz. Příčinou může být příbuzenské křížení neboli *inbreeding*<sup>8</sup> (Leutenegger et al., 2003), včetně jeho nejzávažnější formy, kterou je *incest*<sup>9</sup> (Jakovski et al., 2011); další možnou příčinou je nonpaternita (Brenner, 2003) či jiné závažné okolnosti (např. utajovaná adopce dítěte, které se narodilo nezletilé dívce, její matkou, tedy vlastní babičkou dítěte apod.). S těmito eventualitami musíme vždy počítat.



Obr. č. 2, Vzorci předávání DNA markerů na příkladech rodokmenu

### 2.3.3 Nestandardní situace vzniku jedince

Výše popsané vzorce předávání znaku z rodiče na potomka platí pouze v případě, že jedinec vzniknul standardním způsobem, tzn. splynutím jedné haploidní spermie a jednoho haploidního vajíčka a vyvíjel se z buněk jedné buněčné linie. Existují ale situace, kdy jsou tato pravidla porušena, a dojde ke vzniku jedince s netypickou genetickou výbavou.

Z genetického hlediska jsou monozygotní dvojčata v momentu fyzického oddělení vzájemně zcela identická – mají tedy i stejné pohlaví a stejnou genetickou výbavu. Tento stav nastane, pokud v časně fázi dělení zygoty dojde k vytvoření dvou či více samostatných dělivých center, zygota se rozdělí a započne

<sup>8</sup> Viz kapitola 5.5.

<sup>9</sup> Incest je sexuální styk pokrevně příbuzných osob, tj. v pokolení přímém či mezi sourozenci a v ČR je trestným činem.

vývoj totožných jedinců. Vzniklé rozdíly mezi dvojčaty jsou dány vlivem prostředí na fenotyp a epigenetickými mechanismy (Li et al., 2009).

Chimérismus je stav, kdy se v jedinci vyskytují dvě (i více) buněčných linií původem ze dvou (či více) zygot. Tato skutečnost nastává přirozeně tehdy, pokud po oplození dvou vajíček dvěma spermii vznikne splnutím jeden jedinec; tento jev je označován jako tzv. tetragametický chimérismus (Rinkevich, 2001). Příkladem přirozeného tetragametického chimérismu u lidí může být případ popsáný Rampimem, kdy se u vyšetřovaného muže při testování histokompatibility s jeho bratrem zjistily dvě buněčné linie (Rampim et al., 2007). K chimérismu mohou vést i některé lékařské zákroky, zejména transplantace tkání či celých orgánů od dárce. Speciálním případem chimérismu je tzv. fetální mikrochimérismus, který se rozvíjí v průběhu těhotenství, kdy buňky plodu kolonizují tělo matky (Falik-Borenstein, 1994).

## 2.4 Genealogie

Genealogie neboli rodopis se zabývá vztahy mezi jedinci určitého rodu, sleduje a zaznamenává výskyt určitého znaku a takto získaná data graficky vyjadřuje genealogickými schémata – rodokmeny.

Podle účelu a metod můžeme zhruba vymezit (1) historickou genealogii, (2) genetickou genealogii a (3) populační genealogii.

Historická genealogie je nejstarším typem, jedná se o pomocnou vědu historickou, která se zabývá studiem rodů, přičemž k sestavení genealogického stromu se používají historické záznamy a dokumenty. Přesnost této metody může být v určitém ohledu někdy diskutabilní, přesto je velmi ceněným zdrojem informací jak pro genealogy, tak pro lékaře i genetiky (McEvoy a Bradley, 2006).

Genetická genealogie využívá k sestavení rodokmenu analýzu DNA. K vyloučení možných variant u složitých případů se shromažďují a porovnávají data analýzy variabilních lokusů v rámci autozomů, gonozomů i mtDNA (Ibarra et al., 2013).

Populační genealogie sleduje ancestrálně informativní markery AIMs (angl. *Ancestry informative markers*) jak na liniově předávaných segmentech DNA (Y-chromosomu a mtDNA), tak v kombinujících oblastech genomu (autozomy, X-chromozom); jejím účelem je rekonstruovat šíření lidské populace po kontinentech (Willuweit a Roewer, 2007).

Příloha č. 1 zobrazuje seznam mezinárodně používaných značek a symbolů pro sestavení rodokmenu.

## 3 Forenzní DNA markery

Jakožto *DNA markery* se označují specifické části DNA, které je snadné identifikovat, separovat a vyhodnotit jejich variabilitu spolu se zastoupením v populaci. Obvykle se nachází v nekódujících úsecích DNA, které představují až 75 % DNA (Goodwin et al., 2007), případně, pokud je marker spojen s genem, je obvykle lokalizován v intronech. Pozice DNA markeru na chromozomu se nazývá *lokus*

(pl.: *loci*) a jeho název se buďto odvozuje od genu, se kterým je spjatý<sup>10</sup>, nebo se určuje podle pozice na chromozomu<sup>11</sup> (Butler, 2010).

V kapitole 2.3 jsme rozdělili DNA markery dle lokalizace v genomu na autozomální, X-vázané, Y-vázané a mtDNA a nastínili jsme vzorce jejich předávání mezi generacemi. Tato kapitola se bude věnovat konkrétním typům markerů, jejich charakteristice a potenciálu využití pro identifikační a příbuzenské analýzy.

### 3.1 Charakteristika forenzních DNA markerů

DNA markery se liší nejen svojí lokalizací, ale také svojí strukturou (typem sekvence) a původem. Obecně rozlišujeme dva základní typy polymorfismu - délkový a sekvenční. Podstatou délkového polymorfismu je variabilita délky, tj. počtu bazí, v daném lokusu. Typickým příkladem lokusu, jehož polymorfismus je primárně délkový, je tzv. tandemová repetice, která je tvořena variabilním počtem opakování určitého motivu; dva jedinci se tedy mohou lišit počtem opakování daného motivu, tedy délkou daného místa v DNA. Dalším charakteristickým typem lokusu, jehož variabilita je založena na délkovém polymorfismu, jsou tzv. *Indels* (z angl. *Insertion-deletion*) – drobné, jeden či několik málo nukleotidů zahrnující inserce nebo delece.

Podstatou sekvenčního polymorfismu je naproti tomu rozdíl v sekvenci, neboli záměna jednoho či více nukleotidů v molekule DNA. Změna může nastat substitucí jednoho nukleotidu za jiný. Typickým příkladem sekvenčního polymorfismu jsou jednonukleotidové polymorfismy – *SNPs* (ang. *single nucleotide polymorphisms*). Velmi často je variabilita určitého lokusu v populaci dána kombinovaným, sekvenčně délkovým polymorfismem.

### 3.2 Typy DNA markerů

#### 3.2.1 Minisatelity, VNTR

*Minisatelite* neboli *VNTR* (angl. *Variable number of tandem repeats*) jsou DNA repetice vykazující délkový polymorfismus. Obvyklá délka motivu činí 10 – 100 nukleotidů a počet motivů v rámci repetice může být od několika až po stovky. Jelikož se jednotlivé alely VNTR od sebe liší svojí délkou, je v principu možné pomocí analýzy délky fragmentů, zahrnujících danou repetici, rozlišit lidské jedince (Nakamura et al., 1987). Tento typ markeru se jako první začal využívat pro testování příbuznosti metodou RFLP (Jeffreys et al., 1985).

Příkladem forenzně využívaného minisatelitního DNA markeru může být *HLA DQalpha*, což je genový marker pro lidský leukocytární antigen (lokalizován na 6p21.3). Byl využíván v průběhu 90. let 20. stol., dokud nebyl nahrazen metodou identifikace pomocí STR markerů, a představoval první krok k pozdější analýze SNP (Saiki et al., 1989).

<sup>10</sup> Např. DNA marker TH01 je v oblasti genu kódujícího tyrosin hydroxylázu.

<sup>11</sup> Např. DNA marker D1S80 – chromosom č. 1, single-copy sekvence, 80. pozice na chromosomu.



Příkladem negenového forenzního minisatelitu může být vysoce polymorfní úsek na chromozomu 1, marker *DIS80* s délkou motivu 16 nukleotidů a počtem opakování mezi 14 až 41 opakováními (Kloosterman et al., 1993).

Identifikační kity založené pro testování minisatelitních markerů byly často doplňovány o marker lokalizovaný v intronu genu pro amelogenin (bílkovina zubní skloviny). Tento marker má velikost minisatelitu a je používán při určení pohlaví ze vzorku. Hlavním bodem zájmu je 6 nukleotidů dlouhá delece v intronu na chromozomu X. Detekce této delece pomocí PCR spolehlivě určí homozygotnost (žena) či heterozygotnost (muž) daného lokusu, z čehož lze odvodit pohlaví osoby.

### 3.2.2 Mikrosatelity, STR

*Mikrosatelity* neboli *STR markery* (angl. *Short tandem repeats*) jsou stejně jako VNTR oblasti DNA s variabilním počtem tandemově se opakujících motivů; u STR má tento motiv délku 2-9 nukleotidů (Tautz a Renz, 1984; Butler, 2010). Lidská nDNA je disperzně z cca 3 % tvořena STR lokusy a jejich analýza je v současné době nejpoužívanější identifikační metodou ve forenzní genetice (Butler, 2010; Šimková, 2012).

Název STR markerů se odvozuje od lokusu, ve kterém se marker nachází, popř. u starších markerů se můžeme setkat s triviálními označeními podle toho, u jakého genu se nachází. Příkladem je již výše zmíněný TH01 marker, který dostal název podle genu pro tyrosin hydroxylázu. Systematické názvy se řídí podle chromozomu, typu motivu a pozice na chromozomu. Jako příklad můžeme uvést D18S51 marker nacházející se na 18. chromozomu, jedná se o single-copy sekvenci a je na 50. pozici na chromozomu. Dle počtu nukleotidů motivu rozlišujeme markery di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta-, okta- a nonanukleotidové.

Název alely daného STR lokusu označuje počet opakování motivu. Jako mikrovarianty označujeme takové alely, které nemají úplný počet opakování motivu. Příkladem může být mikrovariantní alela 9.3 markeru TH01, která obsahuje 9 celých opakování tetranukleotidového motivu a neúplné desáté opakování tvořené třemi nukleotidy (Butler, 2010).

STR markery mají při analýze hned několik výhod oproti dříve využívaným VNTR markerům: (1) i vzorek obsahující jen velmi malá množství DNA (v řádu několika buněk) může být úspěšně analyzován, (2) tetranukleotidové markery jsou dostatečně krátké, a lze je tedy úspěšně analyzovat i u částečně degradovaného vzorku, a přitom dostatečně dlouhé, aby nedocházelo k náhodným chybám při amplifikaci pomocí PCR a (3) rychlost i cena analýzy je řádově mnohem nižší (Edwards et al., 1991).

Jak již bylo řečeno, STR analýza je dnes obecně a globálně používanou metodou identifikace osob. Způsob využití takto získaných dat je detailněji rozebrán v kapitole 4 a 5.

### 3.2.3 SNP markery

*SNP markery* jsou tvořeny již výše zmíněnými jednonukleotidovými (bodovými) polymorfismy DNA, které vznikly mutační událostí – substitucí daného nukleotidu, a to buď transicí (záměnou purinové báze za purinovou nebo pyrimidinové za pyrimidinovou) a nebo transverzí (záměnou purinové báze za

pyrimidinovou či naopak). Podobné mutace, jejichž podstatou jsou drobné inserce či delece (již výše zmíněné Indels), se za SNP markery nepovažují. Vznik SNP dvěma po sobě jdoucími mutačními událostmi (inserce a následná delece sousedního nukleotidu nebo *vice versa*) je extrémně nepravděpodobná.

V lidské DNA se nejčastěji setkáváme s tzv. bialelickými SNP lokusy, tedy lokusy, u nichž se v dané populaci vyskytují dvě možné varianty (dva možné nukleotidy). Trialelické či dokonce tetraalelické SNP lokusy jsou vzácné, neboť jejich vznik je podmíněn dvojitou mutační událostí (Hodgkinson et al., 2010).

Jednou z nejčastějších bialelických mutací je záměna C za T. Vysoká frekvence výskytu této substituce je dána tím, že k ní snadno dochází deaminací 5-methylcytosinu na thymin; metylace cytosinu je přitom jedním ze základních mechanismů regulace genové exprese. Po deaminaci se tak v kódu místo původního nukleotidového páru C-G nachází nekomplementární pár T-G, který je buďto ještě před replikací opraven pomocí enzymu TDG (angl. *G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase*), nebo opraven není a tato mutace se fixuje (Holliday et al., 1993).

Výhodou forenzního využití SNP markerů je možnost úspěšné analýzy i u velmi degradovaného vzorku. V počátcích používání této metody časová i finanční omezení vyčlenila analýzu SNP markerů spíše jako doplňkovou část analýzy složitějších případů a jako nástroj populačních studií (Phillips, et al., 2007; Børsting, et al., 2011). Hlavní nevýhodou byla nutnost analyzovat vyšší počet SNP markerů (nejlépe 50 a více lokusů) pro zachování stejné vypovídací hodnoty, jakou má analýza standardního setu 13 STR lokusů.

V budoucnosti, s ohledem na rozvoj celogenomových analýz - WGA (angl. *Wide genome analysis*) a na stále se zlepšující laboratorní zázemí, bude analýza SNP markerů bezpochyby jedním z hlavních nástrojů ve všech oblastech molekulárně genetické analýzy, tedy včetně forenzních aplikací.

### 3.2.4 Hypervariabilní oblasti mtDNA

Mitochondriální DNA představuje velmi specifickou část lidského genomu. Jediná rozsáhlejší nekódující oblast mtDNA se nachází v oblasti tzv. D smyčky neboli kontrolního úseku, kde se započíná replikace těžkého řetězce mtDNA. Oblasti kolem vlastního replikačního počátku (*oriH*) jsou velmi polymorfní, a proto je označujeme jako hypervariabilní – HVR (angl. *Hypervariable regions*).

Nomenklaturně rozlišujeme tyto HV oblasti: HVR1 o délce 341 nukleotidů, HVR2 o délce 267 nukleotidů a HVR3 o délce 136 nukleotidů (délky uvedeny pro standardní rCRS – revidovanou cambridgeskou sekvenci; u konkrétních jedinců se mohou lišit). Tyto HVR vykazují 2 typy polymorfismů, a to jednak polymorfismus sekvenční, mající podobu substitucí jednotlivých nukleotidů, jednak polymorfismus délkový, reprezentovaný drobnými insercemi či delecemi (Goodwin et al., 2007).

MtDNA nemá takové nástroje reparace mutací, jaké se uplatňují v jádře, proto se tyto mutace (pokud nemají vliv na fenotyp) fixují s mnohem vyšší pravděpodobností. Na základě předpokladu, že se dané mutace objevují s konstantní rychlostí, lze získaná data ze sekvenování použít pro potřeby populační

genetiky. Příkladem použití konstantní rychlosti mutací jsou tzv. molekulární hodiny, pomocí kterých lze určit vzdálenost dvou druhů ke společnému předkovi.

V případě testování maternálně liniově příbuzných osob se za platnosti hypotézy o této příbuznosti obvykle předpokládá shoda obou vzorků mtDNA. Výjimku tvoří poměrně vzácná heteroplazmie. Tento pojem popisuje stav, kdy se v jednom jedinci nachází více linií mitochondriální DNA, a to buď v jedné buňce, či v oddělených buněčných populacích (Bendall a Sykes, 1995). Může se jednat o dědičný znak, kdy vajíčko, z něhož jedinec vznikl, již obsahovalo více než jednu linii mitochondrií (Marchington et al., 1998). Může se jednat také o chybu při vzniku zygoty, kdy v buňce zůstaly integrovány a nepoškozeny některé mitochondrie ze spermie (Schwartz a Vissing, 2002). V neposlední řadě může dojít k mutaci u vyvíjejícího se plodu, a poté část buněk jedince bude vykazovat jiný mitochondriální genom.

### 3.3 Liniové markery

V předchozích kapitolách jsme DNA markery rozdělili podle jejich struktury a umístění v genomu. V této části práce se zaměříme na tu část markerů, které se predikovatelně přenášejí z generace na generaci a mohou sloužit jako nástroj genealogům i forenzním genetikům. MtDNA jakožto striktně maternálně se předávající část lidského genomu může posloužit v případech, kdy okolnosti vylučují použití autozomálních markerů, nebo kdy sledujeme maternální linii do historie (degradovaný biologický materiál, nutnost testování vzdálených příbuzných či populační studie). V případě studie zaměřené na paternální linii zkoumáme nerekombinující oblasti chromozomu Y, který je předáván vždy z otce na syna jako identický celek – tzv. haplotyp.

Nejméně často testovaným segmentem genomu, zachovávajícím určitou neúplnou liniovost, je chromozom X. Způsob jeho dědičnosti nevykazuje tak jednoduchý a jednoznačný vzor předávání jako předchozí zmíněné markery, ale výsledky analýzy mohou rozhodnout v některých komplikovaných případech.

#### 3.3.1 MtDNA

MtDNA markery, jejichž základní struktura je popsána v kapitole 3.2, jsou nejčastěji analyzovanými markery u velmi starých či degradovaných biologických vzorků. Přestože jejich diskriminační hodnota je v porovnání s nDNA nízká, počet kopií této molekuly DNA v jedné buňce může přesáhnout i jeden tisíc a pravděpodobnost získání pozitivního výsledku analýzy DNA je tak mnohonásobně vyšší (Stone et al., 2001).

Právě analýza mtDNA je díky svému striktně maternálnímu vzorci předávání a detekční citlivosti společně s analýzou *NR1* (angl. *Non-recombining region of the Y chromosome*) jedním z hlavních nástrojů populační genetiky.

MtDNA se v nezměněné podobě předává z matky na všechny její potomky a na základě tohoto faktu je možné analýzou dostatečně velkých vzorků populace určit, jaké se v populaci vyskytují tzv. mitochondriální haploskupiny a jak jsou frekventované. Tyto haploskupiny se stejně jako u Y

chromozomu liší v bodových mutacích (Brown, 1980; Cann et al., 1982). Fylogenetický strom složený z jednotlivých haploskupin, které se postupně oddělovaly od původních skupin, začíná pro stávající světovou lidskou populaci - u tzv. *mitochondriální Evy* neboli lidského mitochondriálního nejbližšího společného předka - *MRCA* (angl. *Most recent common ancestor*). Odhad doby, kdy tato žena žila, a to v oblasti subsaharské Afriky, se dle různých studií pohybuje mezi 200 000–150 000 př. n. l. (Soares et al., 2009).

Kriminalistická a identifikační genetika používá analýzu mtDNA u těch typů vzorků, kde se nDNA vyskytuje jen v minimálním množství či vůbec (vypadlé vlasy, staré kosterní nálezy atd.); takto se uplatnila např. při identifikaci obětí hromadných neštěstí, jako byl případ Světového Obchodního Centra v roce 2001 (Leclair et al., 2007) či tsunami v jihovýchodní Asii v roce 2004 (Deng et al., 2005).

Prozatímni nevýhodou testování mtDNA je omezené množství vzorků v databázích po celém světě, které snižuje přesnost výpočtů výskytu daného haplotypu.

### 3.3.2 Chromozom Y

Stejně jako je možné sledovat maternální linii pomocí mtDNA, můžeme pomocí Y-markerů sledovat linii paternální. Tzv. pseudoautozomální oblasti chromozomu Y, vyskytující se na koncích malého (*p*) i velkého (*q*) raménka, jsou oblastmi, které mohou volně rekombinovat s chromozomem X a dochází zde stejně jako u autozomů ke crossing-overu. Zbylé, tzv. nerekombinující části (angl. *NR1 Non-recombining region of Y-chromosome*), se obdobně jako mtDNA předávají z generace na generaci jako identický celek a jejich změnu může způsobit pouze mutace (Butler, 2011). NR1 Y-STR markery určují tzv. haplotyp neboli specifickou kombinaci alel v daném místě chromozomu, který se předává v nezměněné podobě z otce na syna. Vyšší celky, tzv. haploskupiny neboli skupiny haplotypů, jsou definovány prostřednictvím konkrétních alel určitých Y-SNP markerů.

Y chromozomální MRCA stávající světové populace je označován jako *Y chromozomální Adam*. Jeho datace jakožto zakladatele fylogenetického stromu recentních Y haploskupin se v posledním několika letech velmi měnila a v roce 2013 dvě výzkumné skupiny přišly s poměrně odlišným výsledkem: 338 000 př. n. l. (Mendez et al., 2013) a 180 000–200 000 př. n. l. (Francalacci et al., 2013).

V současné době nejen na území ČR probíhají projekty typu *Genetika a příjmení*<sup>12</sup>, které mají za úkol ověřit vazbu mužských příjmení, která jsou děděna paternálně, na výskyt Y- vázaných markerů, a určení Y haplotypů u mužů se stejným příjmením (McEvoy a Bradley, 2006). Výsledky liniových studií chromozomu Y nejsou pouze vhodným nástrojem pro populační genetiky, ale také pro genealogy, (Foster et al., 1998) a uplatní se i v oblasti identifikační genetiky (Piccinini et al., 2010).

---

<sup>12</sup> Více informací na <http://www.genebase.cz/.html>.

### 3.3.3 Chromozom X

K analýze chromozomu X se ve forenzní praxi obvykle přistoupí tehdy, pokud z nějakého důvodu není možné vyšetřit autozomální markery, nebo ve velmi specifických situacích. Data získaná analýzou X chromozomu mohou rozřešit komplikované případy testování příbuznosti, což posiluje jejich vypovídající hodnotu a míru využití v rámci forenzních analýz (Butler, 2010).

Důvodem pro použití X-markerů může být například testování vztahu otec-dcera, není-li získán kvalitní výsledek amplifikace autozomálních STR a kvůli své matroklinitě nemůže být použita ani mtDNA. Dalším z příkladů může být použití X-markerů v případě, že potenciální otcové dívky jsou ve vztahu otec a syn, nebo situace, kdy je třeba v případě incestu rozhodnout mezi několika muži z téže rodiny. V takové situaci mají X-markery vyšší vypovídající hodnotu než autozomální lokusy. Analýza chromozomu X může také pomoci potvrdit či vyvrátit maternitu v případě kosterních nálezů v oblastech, kde nejsou dostatečné záznamy o mitochondriálních haploskupinách (Tillmar et al., 2011; Szibor et al., 2003).

## 4 Metodika a analýza DNA

Za zakladatele identifikační analýzy DNA je považován profesor A. J. Jeffreys, který při svém výzkumu na univerzitě v Leicesteru objevil možnost individuální identifikace metodou analýzy polymorfismu restrikčních fragmentů - *RFLP* (angl. *Restriction fragment length polymorphism*), kterou později pojmenoval *DNA fingerprinting* neboli „genetický otisk prstu“ (Jeffreys et al., 1985). Již dříve bylo známo, že molekula DNA vykazuje mezi jedinci řadu polymorfismů (Jeffreys, 1979), ale do roku 1984 nebylo možné na základě DNA jedince rozlišit.

Dnes nejpoužívanější metou analýzy DNA je analýza STR markerů, která v průběhu 90. let 20. století nahradila původní RFLP metodu. Zásadním průlomem v metodice analýzy DNA se stal objev polymerázové řetězové reakce - PCR (angl. *Polymerase chain reaction*) (Kleppe et al., 1971), který umožnil analýzu velmi malých biologických vzorků (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988). Původní Klepého práce z roku 1971 se zabývá reparací fragmentů DNA a určením hraničních velikostí primerů jakožto i replikovatelných úseků. Použit PCR za účelem cílené amplifikace sekvence  $\beta$ -globinu se podařilo až v roce 1985 v laboratoři K. Mullise, který za tento objev v roce 1993 obdržel Nobelovu cenu.

Stále více se rozvíjející analýzou DNA je analýza SNP markerů, o které pojednává kapitola 4.4.

### 4.1 RFLP (restriction fragment length polymorphism)

Restrikční analýza DNA je metoda využívající bakteriální restrikční endonukleázy ke štěpení řetězce DNA na fragmenty. Místo, které restrikční endonukleáza rozpoznává na základě sekvence nukleotidů, se nazývá restrikční oblast; tato oblast je vždy specifická pro danou endonukleázu (Jeffreys et al., 1985). Například: jednou z nejpoužívanějších endonukleáz je Hae III., rozpoznávající sekvenci GG/CC, přičemž místo štěpení se nachází mezi G a C. Obecně platí, že čím je restrikční oblast delší, tím menší počet fragmentů vznikne (Butler, 2010).

Fragmenty jsou poté rozděleny gelovou elektroforézou podle své velikosti. Následně je proveden tzv. Southernův blotting, kdy se fragmenty navážou na nylonovou či nitrocelulózovou membránu. Pro jejich zobrazení lze použít několik různých metod: původní značení radioaktivní sondou bylo nahrazeno bezpečnějšími chemiluminiscenčními sondami, které se specificky vážou na fragmenty a po zviditelnění (rentgen či UV světlo) je možné vzorek vyhodnotit (Southern, 1975).

Metoda RFLP umožňuje nejenom stanovit profil jedince na základě délky a počtu jednotlivých fragmentů, ale má řadu dalších aplikací: například je možné ji použít pro vyhledání mutace způsobující konkrétní nemoc či abnormalitu (Southern, 1975; Gusella et al., 1983). Nevýhodou ovšem zůstává časová náročnost a potřeba značného množství biologického vzorku pro zachování vypovídající hodnoty analýzy.

## **4.2 AmpFLP (amplified fragment length polymorphism)**

Metoda AmpFLP (angl. *Amplified fragment length polymorphism*) je založená na amplifikaci VNTR oblastí DNA pomocí PCR. Oproti RFLP je mnohem rychlejší, ovšem současně má vyšší míru vzniku chyb, jako je např. nepravá heterozygotnost. Nejčastěji analyzovaným markerem byl u této metody minisatelitní lokus D1S80, jenž byl nejprve mnohonásobně amplifikován PCR, a následně (stejně jako u RFLP) byla provedena gelová elektroforéza vzorku. Zviditelnění vzorku se obvykle provádělo barvením stříbrem (Jeffreys et al., 1988; Budowle et al., 1991).

Výhodou této metody byla nižší náročnost na množství biologického vzorku oproti metodě RFLP, ale z důvodu již zmíněné chybovosti a nástupu STR markerů byla spíše mezikrokem a přechodem k masivnímu použití PCR u mikrosatelitních markerů (Butler, 2010).

## **4.3 Analýza STR (short tandem repeats)**

DNA analýza STR markerů je dnes nejběžnější metodou používanou pro testování příbuznosti osob. Počet opakování motivu repetice v konkrétním STR lokusu je mezi jedinci značně variabilní, a je tak možné na základě počtu opakování motivu rozlišit jednotlivé alely (Edwards et al., 1991).

Analýza STR založená na amplifikaci pomocí PCR je schopná detekovat sekvenčně specifickými primery oblast STR markeru, zmnožit tento úsek a následnou elektroforézou (kapilární či gelovou) určit genotyp, tedy sestavu alel jedince (Butler, 2010).

Vypovídající hodnota jednoho lokusu není pro identifikaci dostačující, ale v případě použití více lokusů, které nejsou ve vazbě, tato hodnota násobně roste, až při určitém počtu analyzovaných lokusů je již pravděpodobnost náhodné shody dvou nepříbuzných osob extrémně malá.

Obvyklým postupem určení DNA profilu je analýza standardních DNA markerů, tj. markerů, které vykazují určité specifické žádoucí vlastnosti. Mezi tyto vlastnosti mimo jiné řadíme např. širokou škálu alel s relativně vyváženými frekvencemi, žádnou či jen slabou vazbu k fenotypu jedince, vysokou

heterozygotnost a další. To, které konkrétní markery se budou analyzovat, je věcí mezinárodních dohod; tyto markery pak tvoří tzv. doporučené či povinné systémy či sety, které se částečně překrývají.<sup>13</sup>

#### 4.4 Analýza SNP (single nukleotide polymorphism)

Analýza SNP markerů, které jsou nejhojnějšími DNA polymorfismy, má nesmírně široký aplikační potenciál a své uplatnění nachází i ve forenzní oblasti. Metod, které se používají pro tyto studie, je poměrně velké množství a jejich konkrétní volba závisí na mnoha faktorech.

##### 4.4.1 Sangerova metoda sekvenace

Tzv. *Sangerova metoda*<sup>14</sup> se ve forenzní oblasti běžně používá pro sekvenaci mtDNA starých kostí, zubů či vlasů, neboť je vhodná pro studium těch oblastí genomu, kde je vysoká hustota SNP. Takovými oblastmi jsou právě HVR mtDNA, kde se v průběhu evoluce kumulovalo velké množství mutací. Sangerova sekvence je založena na syntéze komplementárního vlákna DNA k templátu pomocí DNA polymerázy a radioaktivně značeného primeru. Pořadí nukleotidů se následně zjistí tak, že ve směsi pro syntézu vlákna jsou přítomny nejen obvyklé nukleotidy, ale také jejich dideoxy formy (tzv. terminátory), které, pokud jsou DNA polymerázou komplementárně přiřazeny, ukončují (terminují) syntézu vlákna DNA. Při přítomnosti více kopií templátu ve směsi reakce probíhá současně a po ukončení polymerace obsahuje výsledná směs velké množství fragmentů DNA o různé délce začínající radioaktivně značeným primerem a končící vždy stejným nukleotidem (např. dideoxy formou T). Následná gelová elektroforéza rozdělí fragmenty podle velikosti, a je tak možné určit přesnou polohu komplementárního nukleotidu a na templátovém vlákně DNA (Sanger a Coulson, 1975).

##### 4.4.2 Metody využívající DNA hybridizace

*Alelicky specifická hybridizace DNA* pomocí sekvenčně specifických sond je nejjednodušší metodou analýzy SNP markerů. Jedním z příkladů je tzv. *čipová hybridizace* (angl. *Microarray*), vycházející z původních prací s markerem HLA DQalpha (Saiki et al., 1989). Fluorescenčně značená alela se komplementárně naváže na ukotvenou sekvenčně specifickou sondu na čipu a po excitaci laserem se daná barva v místě sondy zaznamená počítačem. I jednobodová mutace v místě vazby sondy dokáže hybridizaci natolik destabilizovat, že nedojde k jejímu navázání, a omezuje se tak vznik chybného signálu (Wang et al., 1998).

Dalším způsobem využití hybridizace DNA je tzv. *dynamická alelicky specifická hybridizace - DASH* (angl. *Dynamic allele-specific hybridization*), která k určení a lokalizaci SNP využívá rozdílnou teplotu denaturace DNA (SNP snižují stabilitu DNA). PCR reakce je provedena s primery označenými biotinem, který se naváže na ukotvený streptavidin, a poté je přidána alelicky specifická fluorescenčně označená sonda. Teplota, při které dojde k rozvolnění vazby sonda-alela, je zaznamenána a je porovnávána s kontrolními hodnotami (Howell et al., 1999).

<sup>13</sup> Např. *CODIS* (angl. *Combined DNA Index System*), *SGM plus* (angl. *Second Generation Multiplex Plus*) nebo *ESS* (angl. *The European Standard Set*).

<sup>14</sup> F. Sanger (13. 8. 1918 – 19. 11. 2013), dvounásobný laureát Nobelovy ceny z roku 1958 a 1980.

Metody využívající molekulární sondy, např. tzv. „*Molekulární majáky*“ (angl. *Molecular beacons*), jsou postaveny na specifickém způsobu hybridizace DNA pomocí těchto sond. U zmíněných majáků jsou oba konce sondy navrženy tak, aby k sobě byly komplementární, přičemž jeden je značen fluoroforem a druhý jeho zhášecem (quencherem), a specifická sekvence pro vazbu DNA je tak v „očku“ vlásenky (Kostrikis et al., 1998; Tyagi, 1998). K aktivaci fluoroforu dojde pouze v případě, že specifická sekvence najde komplementární místo na DNA a dojde k hybridizaci (sonda zaujme stabilnější pozici).

*Taq DNA polymeráza*, která disponuje 5' nukleázovou aktivitou, se využívá v tzv. *Taqman analýze* při real-time PCR. Na jednovláknovou molekulu DNA se naváže specificky závislá sonda s fluoroforem a jeho zhášecem (Livak, 1999). Pokud Taq polymeráza při repolymerizaci komplementárního vlákna narazí na sondu, díky své 5' nukleázové aktivitě sondu rozštípe a dojde k emitaci barvy fluoroforem.

#### 4.4.3 Metody využívající Primer extension

*Prodloužení primeru* (angl. *Primer extension*) je dalším z principů analýzy SNP. Základní schéma se dá rozdělit do dvou separovaných kroků: (1) PCR amplifikace konkrétní sekvence obsahující SNP a (2) hybridizace fragmentu na sondu následovaná DNA polymerací.

Jednou z metod detekce je *APEX (Arrayed Primer Extension)*, kde sondy jsou upevněny na čipu a DNA polymeráza doplní volný konec (obsahující SNP) hybridizovaného fragmentu fluorescenčně značeným dideoxynukleotidem. Výsledná emitace barvy určí, který ze čtyř nukleotidů je na zkoumaném lokusu (Shumaker et al., 1996; Pastinen et al., 1997; Dubiley et al., 1999). Alelicky specifické prodloužení primetu oproti tomu využívá RNA templátů jako produktů PCR a polymeraci zajišťuje reverzní transkriptáza (Pastinen et al., 2000).

Detekce signálu je možná za pomoci detekčních nástrojů na principu *FRET* (angl. *Fluorescence resonance energy transfer*) detekce, *FP* (angl. *Fluorescence polarization*) detekce, hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS (angl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization*) či *pyrosekvenování* (Chen a Kwok, 1997; Chen et al., 1997; Chen et al., 1999; Ross et al., 1998). Pyrosekvenování využívá enzymatické přeměny pyrofosfátu (vzniklý z dideoxynukleotidu) na ATP, které pohání emitaci světla přidané luciferázy (Ronaghi, 2001).

#### 4.4.4 Metody využívající DNA ligázu

Analýza SNP markerů využívající *DNA ligázu* má potenciál amplifikovat nejen konkrétní úsek DNA (v případě kombinace s PCR), (Chen et al., 1998), ale při správné volbě sond i mnoho lokusů v rámci celého genomu. Tyto sondy nasedají těsně k SNP a umožní polymeraci DNA pomocí ligázy (Lizardi et al., 1998; Baner et al., 1998).

V případě, že jsou jednotlivé nukleotidy fluorescenčně značeny, je možné vyhodnotit data pomocí gelové či kapilární elektroforézy nebo hmotnostní spektrometrií.

#### 4.4.5 Metoda Invader

Metoda *Invader* je další z metod analýzy SNP nevyžadující PCR. Je založena na funkci tzv. *FEN* (angl. *Flap endonuclease*), která je vysoce citlivá na jednobodové mutace (Kaiser, 1999). V průběhu



analýzy se na polymorfní oblast DNA navážou dvě oligonukleotidové sondy, a jakmile se tak stane, vznikne trojrozměrná struktura rozpoznávaná FEN. Ta začne tuto trojrozměrnou strukturu štípat a v případě značení fluoroforem se emituje barva. Analýzu je možné provést i pomocí hmotnostní spektrometrie (Griffin et al., 1999; Olivier, 2009).

Metoda je vysoce specifická, její dnes nejpoužívanější modifikací je tzv. *SISAR* (angl. *Serial invasive signal amplification reaction*), která dovoluje analýzu dvou alel zároveň oproti původní jedné (Olivier, 2009).

## 5 Hodnocení příbuznosti dle DNA

V předchozích kapitolách bylo vysvětleno, co to jsou DNA markery, a byla popsána jejich analýza. Pro potřeby forenzní genetiky jsou získaná data dále zpracovávána, protože nestačí pouhé triviální vyjádření shody vzorků, ale je nutné vypočítat, jak silným důkazem pro danou hypotézu výsledek analýzy je. Historicky byla tato důkazní váha počítána různě, v současné době převažuje bayesovský přístup kombinovaný s určováním frekvencí (pravděpodobností) genotypů z frekvencí alel při platnosti Hardy-Weinbergova zákona (Thompson, 1976; Marshall et al., 1998). Tato kombinace umožňuje odhadovat pravděpodobnost jednotlivých hypotéz i v obtížnějších případech, jako jsou směsi DNA více osob, incesty či vzdálená příbuznost jedinců (Buckleton et al., 2005; Evett a Weir, 1998; Drábek, 2011).

### 5.1 Pravděpodobnost

*Pravděpodobnost P* považujeme za stupnici pro úroveň důvěry v nějaké tvrzení či hypotézu založenou na rozumové analýze nám dostupných informací. V ideálním případě nabývá hodnota pravděpodobnosti 1 nebo 0 podle toho, zda jev nastal nebo ne. Nekompletní informace a jiné komplikace ale neumožňují jednoznačně určit, zda je tvrzení pravdivé ( $P = 1$ ) nebo nepravdivé ( $P = 0$ ). Proto se nejčastěji setkáme s procentuálním vyjádřením důvěry v danou hypotézu, např. platí 50% pravděpodobnost (neboli  $P = 0,5$ ), že na klasické hrací kostce padne sudé číslo (Drábek, 2011; Marshall et al., 1998; Elston, 1986; Thompson, 1976).

Chceme-li vyjádřit, jak pravděpodobný je jev A, pokud už nastal jiný jev B neboli pokud už máme určitou informaci nebo důkaz E, užíváme tzv. podmíněnou pravděpodobnost. Podmíněnou pravděpodobnost obecně označujeme jako  $P(\text{tvrzení}|\text{informace})$ , přičemž existují 3 zákony pravděpodobnosti a doplňující výroky (Buckleton et al., 2005).

#### 5.1.1 První zákon pravděpodobnosti

Základní definicí pravděpodobnosti je  $P(A|E)$  tzn. pravděpodobnost jevu A za předpokladu, že platí E. Pravděpodobnost jevu A nabývá hodnot mezi nulou a jedničkou a v praxi vždy platí  $0 < P(A|E) < 1$  a zároveň  $P(A|E) + P(\bar{A}|E) = 1$  (při stejných podmínkách vždy nastane alespoň jeden z možných jevů), (Evett a Weir, 1998).

### 5.1.2 Druhý zákon pravděpodobnosti o sčítání pravděpodobností

Pro neslučitelné jevy, které za daných podmínek nemohou nastat zároveň, platí vyjádření  $P(A \cup B) = P(A|E) + P(B|E)$ . Výslednou pravděpodobností je součet dvou zájemně se vylučujících jevů a platí  $P(A|B) = 0$ .

Pro slučitelné jevy, tj. jevy které mohou, ale nemusí nastat zároveň, platí vyjádření  $P(A \cup B) = P(A) + P(B) - P(A \cap B)$ , (Evelt a Weir, 1998; Drábek, 2011).

### 5.1.3 Třetí zákon pravděpodobnosti o násobení pravděpodobností

Pravděpodobnost současného výskytu dvou nezávislých jevů A a B, lze určit jako  $P(A \cap B) = P(A) \times P(B)$ . Pro nezávislé jevy rovněž platí:  $P(A|B) = P(A)$ . Pravděpodobnost současného výskytu dvou závislých jevů je  $P(A \cap B) = P(A|B) \times P(B)$ , protože výskyt jevu A je závislý na pravděpodobnosti výskytu jevu B (Evelt a Weir, 1998; Drábek, 2011).

## 5.2 Šance

Šance O udává, kolikrát je pravděpodobnější tvrzení A než opačné tvrzení  $\bar{A}$  a je vyjádřena vzorcem  $O(A) = P(A) / P(\bar{A})$ . Jako příklad můžeme uvést výpočet šance, že na kostce padne číslo vyšší než čtyři. Tzn., že  $P(A) = 2/6$  a  $P(\bar{A}) = 4/6$ , výsledná šance je  $1/2$  (1 ku 2, že padne číslo vyšší než čtyři). Ze šance je možné vypočítat pravděpodobnost podle vzorce  $P(A) = O(A) / 1 + O(A)$ , (Drábek, 2011).

## 5.3 Hardy-Weinbergův zákon o alelách

Hardy-Weinbergův zákon o alelách popisuje frekvence genotypů jako funkce alelických frekvencí. Platí pro ideální nereálnou populaci (je nekonečně velká, probíhá v ní náhodné páření, neprobíhá selekce, mutace ani migrace), ale je možné jej použít pro reálnou populaci. Pro dvoualelový systém  $p$  a  $q$  platí:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \text{ (Hardy, 1908; Weinberg, 1908).}$$

Hardy-Weinbergův zákon se využívá při výpočtech frekvencí alel, jež jsou dále užity pro výpočet věrohodnostního poměru LR pro testovaný genotyp lokusu. Pokud daný lokus HWE nesplňuje, je v některých případech možné výpočet upravit započtením parametru příbuznosti.

## 5.4 Bayesova věta

Bayesova věta je matematické vyjádření, které upravuje pravděpodobnostní očekávání ve světle nových důkazů (Bayes a Price, 1763). Umožňuje jistou míru subjektivity a může být vyjádřeno pravděpodobností či šancí. Hlavními složkami Bayesovy věty jsou tzv. *aposteriorní šance*, *věrohodnostní poměr* a *apriorní šance*

$$\frac{P(H_A|E, I)}{P(H_B|E, I)} = \frac{P(E|H_A, I)}{P(E|H_B, I)} \times \frac{P(H_A|I)}{P(H_B|I)}$$

Apriorní šance neboli ohodnocení pravděpodobnosti před tím, než byla provedena analýza DNA, je založena na nevědecké informaci (výslech svědků, náhrobní kámen u hrobu, pohyb pohřešované osoby na

místě nálezů ostatků atd.). LR při použití v Bayesově větě aktualizuje apriorní šanci při nálezů nových důkazů. Aposteriorní šance je celkovou šancí, že tvrzení je pravdivé po předložení a prozkoumání všech důkazů. Pomocí vzorce v kapitole 5.2 je možné dopočítat z aposteriorní šance pravděpodobnost (Drábek, 2011).

#### 5.4.1 Hypotézy při analýze příbuznosti

Postulace testovaných hypotéz  $H_A$  a  $H_B$  je založena na faktu, že tyto hypotézy musí být při stejném důkazu (výsledku analýzy)  $E$  navzájem vylučující. Základní analýza zahrnuje dvojici alternativních hypotéz, pro kterou se následně vypočítává LR; v komplikovanějších případech je třeba vypočítat LR pro více dvojic hypotéz. Příkladem může být testování příbuznosti sourozenců (úplní sourozenci vs. poloviční sourozenci vs. nepříbuzné osoby). To, jestli je hypotéza vhodná pro testování, záleží na její realitě, kterou odvozujeme z okolností případu (např. nereálné vznesení hypotézy otcovství v případě, že data narození otce a potomka jsou v takové blízkosti, že neumožňují paternitu). Vhodnými důkazy podporujícími vznesení hypotézy jsou např. rodinné dokumenty, výpovědi příbuzných či zjevná vzhledová podobnost (nález zaměněného jednovaječného dvojčete).

#### 5.4.2 Apriorní pravděpodobnost a šance

*Apriorní pravděpodobnost*  $Pr$  a šance je obvykle subjektivně udaný podíl důvěry v platnost dvou alternativních hypotéz, založený na důkazech získaných před analýzou DNA. Apriorní pravděpodobnost nabývá hodnot mezi 0 a 1, přičemž hodnota 0,5 znamená 50% pravděpodobnost platnosti hypotézy  $H_A$  i  $H_B$ , a je hodnotou neutrální. Ve většině případů, pokud není silný negenetický důkaz, udává se apriorní pravděpodobnost právě 0,5, v opodstatněných případech je ale možné  $Pr$  stanovit např. na základě vlastní zkušenosti nebo ji i vypočítat (Brenner a Weir, 2003). Vhodným příkladem výpočtu  $Pr$  jsou hromadná neštěstí dopravních prostředků, kde se apriorní pravděpodobnost totožnosti oběti odhaduje podle vzorce

$$Pr = \frac{1}{N},$$

kde  $N$  odpovídá počtu osob v dopravním prostředku. Výsledná  $Pr$  udává, s jakou pravděpodobností analyzovaný vzorek z náhodně vybraného těla patří konkrétní osobě, která byla na palubě.

Pomocí hodnoty  $Pr$  je možné vypočítat apriorní šanci (prior odds) a to jako

$$\text{Prior odds} = \frac{Pr}{1-Pr}.$$

#### 5.4.3 Věrohodnostní poměr LR

*Věrohodnostní poměr LR* (angl. *Likelihood ratio*) je hodnota vyjadřující podíl dvou pravděpodobností výsledku zkoumání (např. genotyp) při různých hypotézách, přičemž hypotézy jsou vzájemně se vylučující. Jeho základní funkcí je zhodnotit váhu veškerých vědeckých důkazů pro obě hypotézy.

Věrohodnostní poměr lze vypočítat jako

$$LR = \frac{P(E|H_A,I)}{P(E|H_B,I)},$$

kde  $H_A$  je hypotéza testovaného vztahu mezi dvěma osobami, např. prarodič-vnouče,  $H_B$  je alternativní hypotéza, často hypotéza, že testovaní jedinci jsou nepříbuzné osoby původem z téže populace,  $E$  jsou genetické (nebo jiné vědecké) důkazy,  $I$  jsou nevědecké důkazy.

LR nabývá jakýchkoliv hodnot větších než nula. Pokud je  $LR < 1$ , pak je jev pravděpodobnější při hypotéze  $H_B$ . Pokud je  $LR = 1$ , jsou obě hypotézy stejně pravděpodobné, protože se nelze přiklonit ani k jedné z variant. V případě, že je  $LR > 1$ , pak je jev pravděpodobnější při hypotéze  $H_A$  (Buckleton et al., 2005; Evett a Weir, 1998; Drábek, 2011; Marshall et al., 1998).

Při důkazech založených na genetické analýze je  $P(E|H_A, I)$  a  $P(E|H_B, I)$  určeno pravděpodobnostmi zjištěných genotypů za platnosti dané hypotézy, které se odvozují ze známých frekvencí alel pro danou populaci (Haas et al., 2013).

Pomocí výše zmíněného vzorce je možné kombinovat jednotlivě vypočtené LR pro konkrétní lokusy do celkového *CRI* (angl. *Combined relationship index*). Pro nezávislé testované lokusy je CRI součinem všech dílčích LR a výsledná hodnota udává, jaký je podíl pravděpodobnosti, že námi zjištěné genotypy budou stanoveny u osob příbuzných v určitém definovaném příbuzenském stupni či vztahu, a pravděpodobnosti, že budou stanoveny za platnosti alternativní hypotézy (nejčastěji, že se jedná o osoby nepříbuzné). Např. v případě testování základního setu 13 STR lokusů označovaných jako CODIS Core Loci je CRI součinem všech 13 LR pro jednotlivé genotypy v lokusech.

#### 5.4.4 Aposteriorní pravděpodobnost a šance

Aposteriorní pravděpodobnost a šance je konečným výstupem Bayesovy věty a matematicky vyjadřuje poměr pravděpodobností  $H_A$  a  $H_B$  ve světle všech genetických i negenetických důkazů. Jinak řečeno udává, která z námi postulovaných hypotéz je pravděpodobnější. Pomocí vzorce

$$\text{Aposteriorní pravděpodobnost} = \frac{\text{CRI} \times \text{Pr}}{\text{CRI} \times \text{Pr} + (1 - \text{Pr})}$$

je možné na základě určené (či vypočítané) apriorní pravděpodobnosti  $\text{Pr}$  a vypočítaného kombinovaného CRI pro všechny testované lokusy vypočíst celkovou pravděpodobnost postulovaného vztahu. V případě paternitního testování je CRI označován jako *paternity index* – *PI* (Drábek 2011).

Převést číselnou hodnotu aposteriorní pravděpodobnosti do takového vyjádření míry jistoty, které by bylo blízké uvažování běžného člověka-nematematika, je obecně vnímáno jako obtížný úkol; např. Hummel (1969) navrhl, aby interval hodnot celkové aposteriorní pravděpodobnosti otcovství *PI* odpovídal určitému slovnímu vyjádření, které by mohlo být prezentováno např. u soudu - viz příloha č. 2.

### 5.5 Interpretace analýzy autozomálních lokusů

Hodnocení příbuznosti na základě analýzy autozomálních lokusů se řídí vzorcem předávání (kapitola 2.3), který předpokládá, že ve vztahu rodič-potomek bude potomek mít vždy právě jednu alelu od otce a jednu od matky. Takováto alela se nazývá *alela shodná původem* (*IBD alela* – angl. *Identity by descent*) a pochází od společného předka, od kterého byla zděděna (Leutenegger et al, 2003).

Druhou z možností je tzv. *alela shodná stavem* (*IBS alela* – angl. *Identity by state*), která je sice obdobně jako IBD u obou osob shodná, ale jedná se pouze o mutační jev, kdy dvě nepříbuzné osoby sdílejí stejnou alelu vlivem mutace (koincidenčně) a nemají společného předka – původce této alely (Leutenegger et al, 2003).

S určitou relativně malou četností se lze setkat s opačným jevem, kdy na spojnici mezi testovanými osobami dojde k mezigenerační mutaci alely IBD. V tom případě, ačkoli tato alela pochází od společného předka, není shodná stavem. Proto je při přesných výpočtech LR nutno započítávat frekvenci mutací dané alely. Jelikož se používá více typů mutačních modelů (např. uniformní, proporcionální, klesající či krokový), je vhodné provést výpočty LR pro více než jeden model mutace daného lokusu. Frekvence mutací u běžně používaných STR lokusů se pohybuje mezi 0,01 % (TH01) až 0,64 % (SE33)<sup>15</sup>. Dále se při výpočtu LR s možnou mutací zahrnuje i pravděpodobný typ mutace (SNP vs. STR) a její směr. Pravděpodobnost mutace je obecně dynamická veličina, například se zvyšuje s věkem rodičů jedince, mutagenními vlivy, jako je záření, či při silném znečištění vzduchu (Jones et al., 1975).

Komplikací při určování příbuznosti pomocí autozomálních markerů je často nepřítomnost všech příbuzných osob vhodných pro testování (matka-dítě-otec × dítě-otec) a se vzdáleností příbuzenství se snižující předpokládaná procentuální shoda alel u testovaných osob (viz příloha č. 3) při absenci imbreedingu. Některé hypotézy mají navíc stejné LR pro různý typ biologického příbuzenského vztahu, a nelze tudíž mezi nimi rozlišit (např. poloviční sourozenci vs. strýc-synovec).

V případě izolovaných populací je nutné při výpočtu LR započítávat *koeficient imbreedingu*  $\theta$  ( $F_{ST}$ ), (Wright, 1922). Ten udává, jaká je pravděpodobnost, že námi studované alely dvou nepříbuzných osob z této populace jsou shodné původem (Dorsten et al., 1999). Obvyklé rozmezí koeficientu  $\theta$  se pohybuje mezi 0,005 až 0,03 v závislosti na dané populaci. Obecně platí, že asijské populace mají tento koeficient vyšší nežli populace Evropy či USA, ale záleží na konkrétní studii (Bittles et al., 1991).

Základním předpokladem kvalitních výsledků je analýza dostatečného množství lokusů pro dané hypotézy. Se zvyšujícím se počtem testovaných polymorfismů se snižuje pravděpodobnost chybně pozitivního či negativního výsledku. To má za následek, že u komplikovanějších příbuzností se i několikanásobně navyšuje počet testovaných lokusů - příkladem je použití 15 STR lokusů a 49 SNP při komplikovaném testování příbuznosti (Børsting a Morling, 2011).

## 5.6 Interpretace analýzy liniových markerů

Pomocí interpretace analýzy liniových markerů nelze z důvodu jejich dědičnosti určit konkrétní vztah mezi jedinci, ale na jejím základě je možné najít jedince patřící do jedné rodové linie (ať už maternální či paternální). Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3, specifický způsob předávání této genetické informace, daný počet generací mezi testovanými osobami a předpokládaná frekvence mutací umožňuje vybrat skupiny jedinců, kteří si jsou navzájem příbuzní. Příkladem může být hypotetický nález hromadného hrobu dvanácti osob, kde analýzou mtDNA byly určeny 3 haplotypy. Na základě této informace můžeme

<sup>15</sup> Konkrétní údaje o mutační frekvenci lokusu na <http://www.cstl.nist.gov/strbase/mutation.htm>.

uvažovat, že se jednalo o členy tří rodin, kteří byli z nějakého důvodu pohřbeni spolu (alternativní hypotézou může být přítomnost jen jedné rodiny a dvou nepříbuzných mužských jedinců).

Výpočet LR pro konkrétní haplotyp mtDNA se provádí obdobně jako u autozomálních markerů, tedy vychází z frekvence daného haplotypu ve studované populaci; ve srovnání s autozomálními markery je zde vyšší frekvence mutací (Ermini et al., 2008; Gill et al., 1994).

Interpretace výsledků analýzy Y-chromozomu je velmi podobná jako u mtDNA, tj. výpočet LR vychází z frekvence daného haplotypu v konkrétní studované populaci. Průměrná úroveň mutace u Y-STR markerů se pohybuje okolo  $1,72 - 4,94 \times 10^{-3}$  (Kayser et al., 2000) a započítává se v kombinaci počtu generací mezi testovanými osobami.

Analýza liniových markerů je nejčastěji používána v populačních studiích a u významných osob či rodů, které díky své významnosti mají mnohdy velmi podrobně vedené rodokmeny (Haas et al., 2013). Konkrétní kazuistiku obsahuje kapitola 7.

## **6 Propojení DNA analýzy a rodokmenových studií**

Výsledky analýzy DNA většího vzorku osob představují tak velký soubor informací, že pouhým ručním počítáním výše zmíněných pravděpodobností je velmi složité se dobrat konkrétního výsledku. Základní výpočty jsou proto prováděny počítačovými softwary přímo určenými pro danou problematiku (populační studie, sestavení rodokmenu atd.). Tato kapitola představuje možnosti využití programů, následná kapitola 7 obsahuje podrobnější konkrétní kazuistiky.

### **6.1 Genealogické a DNA profilovací softwary**

Genealogické softwary jsou programy pro správu, organizaci a sdílení genealogických dat, které uživateli dovolují sestavit vlastní rodokmen. Mezi základní funkce patří určení vztahů mezi jedinci a zadání osobních dat - jmen, pohlaví, dat narození a úmrtí a povolání. Tato data, pokud jsou uživatelem poskytnuta veřejně, mohou vygenerovat komplexní rodokmeny při nalezené shodě a propojit vzdálené rodové linie.<sup>16</sup>

Naproti tomu DNA profilovací softwary umožní nejen sledovat vztahy mezi jedinci, ale hlavním úkolem těchto programů je na základě dat z DNA analýzy určit či potvrdit příbuznost jedinců. Cílem profilovacích programů je urychlit vyhodnocení výsledků a minimalizovat chyby pomocí algoritmů. I přes vysokou spolehlivost je vždy nutný zásah odborníka při sporné příbuznosti či velmi komplikovaných případech. Konečným výstupem je hodnota LR pro dané hypotézy dle použitého algoritmu (Drábek, 2009; Brenner, 1997).

### **6.2 Praktické použití forenzních softwarů**

V praxi je použití softwarů pro rekonstrukci složitých rodokmenů jedinou možností, jak zachovat vypovídací hodnotu dat. To, jaký software a konkrétní algoritmus se použije, závisí na dané studii

---

<sup>16</sup> Na trhu je velké množství volně stažitelných i zpoplatněných verzí, např. Family Tree Builder či Ancestry.

a možných komplikací při statistických výpočtech. Zde uvádíme jen příklady programů, např.: *FRANz* (Riester et al., 2009), *KINGROUP* (Konovalov et al., 2004), *CARROT* (Kyriazopoulou-Panagiotopoulou et al., 2011), *GeneMarker®HID* (Holland et al., 2011), *DNA-VIEW™*<sup>17</sup> či programy založené na metodě *MCMC* (angl. *Markov chain Monte Carlo*), (Gasbarra et al., 2007). Některé další v konkrétních kazuistikách užívané softwary jsou uvedeny v kapitole 7.

Forenzní softwary dokážou zpracovat nejenom data získaná analýzou DNA, ale mezi funkce některých z nich patří i možnost modelování rodokmenu na základě dat z negenetických zdrojů, jako jsou údaje z matrik (Agarwala et al., 1998).

Jedním z nejdůležitějších případů použití komplexních softwarů a algoritmů pro určení příbuznosti osob jsou hromadná úmrtí osob s komplikovanými podmínkami vizuální identifikace. Databáze, se kterou program poté pracuje, vyhodnocuje DNA profil jedince jakožto i možnou shodu s jiným již určeným vzorkem (pokud se např. jedná o fragmentovaná těla). Testovanými osobami v tomto případě jsou příbuzní 1. nebo 2. stupně (případně vzdálenější, pokud předchozí zmínění nejsou k dispozici) a do analýzy je zahrnut i vzorek pohřešované osoby (pokud je k dispozici), (Brenner a Weir, 2003; Leclair et al., 2007). Konkrétní příklady obsahuje kapitola 7.

## 7 Kazuistika

V předchozích kapitolách byly vysvětleny základní principy dědičnosti, tvorba rodokmenů, metodika i interpretace DNA analýzy. Tato kapitola shrnuje vše výše zmíněné v konkrétních případech využití DNA analýzy jako nástroje pro rekonstrukci rodokmenů, populačních studií a identifikace osob.

### 7.1 Identifikace ostatků cara Mikuláše II. a jeho rodiny

Případ popravy cara Mikuláše II. a jeho rodiny je ukázkou rozdílných přístupů odborníků ke konkrétnímu případu. V roce 1917 v průběhu Ruské revoluce car Mikuláš II. z rodu Romanovců abdikoval a byl společně se svojí manželkou carevnou Alexandrou, pěti dětmi a služebnictvem uvězněn. Poslední místo doloženého pobytu rodiny bylo nedaleko města Jekatěrinburg, kde podle svědectví měli být popraveni a pohřbeni. V roce 1989 bylo místo hrobu oficiálně objeveno a v roce 1991 byla těla exhumována. Hromadný hrob devíti osob podle analýzy mtDNA obsahoval pozůstatky carevny Alexandry a jejích 3 dětí, cara Mikuláše II. a čtyř osob z řad služebnictva. Analýza ostatků carevny Alexandry byla provedena na základě srovnání se vzorkem DNA Prince Filipa, vévody z Edinburghu, který je synem neteře carevny z matčiny strany, a proto zde byla předpokládána shoda mtDNA. Ostatky cara Mikuláše II. byly porovnávány s mtDNA z exhumovaných ostatků jeho bratra Gerogije Romanova. Zbývající dvě děti – jedna z dcer a syn Alexej - v hrobu přítomny nebyly (Gill et al., 1994; Ivanov et al., 1996).

---

<sup>17</sup> Více na <http://dna-view.com/dnaview.htm>.

V roce 2007 byl nedaleko prvního hrobu objeven druhý hrob obsahující ostatky dvou těl. Na základě testování paternální linie Y-chromozomu dodnes žijícího Prince Andrew Andrejeviče Romanova bylo potvrzeno, že jedno z těl patří pohřešovanému carevičovi Alexeji a mtDNA potvrdila i přítomnost jedné z jeho sester (Rogaev et al., 2009; Coble et al., 2009).

Tímto případem bylo potvrzeno, že kriticky důležité je správné postulování hypotéz a analýza provedená na dostatečném množství lokusů. Po testování v roce 1994 bylo vzneseno poměrně velké množství stížností na nedostačující studovaný materiál (z každé kostry femur a z předpokládané kostry cara i tibie); zářející je i fakt, že podle některých zdrojů byla těla exhumována od období popravy hned několikrát. To vše vzneslo nejistotu do správnosti výsledků analýzy a až poslední studie byly schopné určit původ ostatků (Zhivotovski, 1999).

## **7.2 Ötzi, Tyrolská ledová mumie**

V září roku 1991 bylo v Tyrolských Alpách nalezeno mumifikované tělo muže, přičemž následná datace dle izotopu  $^{14}\text{C}$  určila jeho stáří na 5100 až 5300 let, což odpovídá období pozdního neolitu. Z těla bylo odebráno 8 vzorků DNA, které poté byly analyzovány, ale z důvodu jejich vysoké degradace bylo možné provést pouze analýzu mtDNA. Ta byla zatížena vysokou bakteriální kontaminací, ale dvě nezávislé laboratoře v Oxfordu v Anglii určily stejnou sekvenci HVR1 oblasti pro lidskou mtDNA, a mohlo se tak postoupit k poslednímu kroku testování – nalezení konkrétní haploskupiny. Na základě dostupných dat bylo určeno, že haplotyp Ötziho se nejvíce blíží recentním jedincům ze střední a hlavně severní Evropy, nositelům haploskupiny K (Handt et al., 1994).

V roce 2000 byla provedena další analýza pomocí pyroskevenovacích metod a bylo určeno, že Tyrolská mumie spadá do haploskupiny K1, ale tato konkrétní variace zatím nebyla v Evropě zaznamenána (Ermini et al., 2008). Pozdější práce z roku 2012 a 2013 analyzovala i polymorfismy Y-chromozomu a zjistila, že haploskupina G-L91, do které muž patří, je v oblasti Tyrol vzácná a vyskytuje se přibližně u 0,5% mužů (Keller et al., 2012; Berger et al., 2013).

Tento případ ilustruje zjevný pokrok v technice a tím i možnostech analýzy DNA – původně jen těžko analyzovatelná DNA byla po 6 letech od prvních pokusů kompletně analyzována (Keller et al., 2012).

## **7.3 Y-chromozomová analýza kostních ostatků Jörga Jenatsche (1596–1639)**

Jörg Jenatsch byl švýcarský bojovník za nezávislost v době třicetileté války, žijící v letech 1596–1639. Během svého života se stal velmi vlivnou osobou a v důsledku historických okolností byl v roce 1639 zavražděn ve švýcarském městě Chur (Haas et al., 2013). Hrob byl objeven v roce 1959 v katedrále města Chur a v roce 2012 byla povolena exhumace těla za účelem odebrání vzorku pro Y-chromozomovou analýzu. K testování byli přibráni 3 dodnes žijící potomci Jörgovy linie a byl pořízen kontrolní vzorek pro detekci možné kontaminace. Hlavní testovanou hypotézou bylo to, že nalezené ostatky patří Jörgu Jenatschovi. Byly použity dva přístupy pro výpočet LR – jednak podle Kaysera et al. (2007), a dále druhý, používající postupnou redukci genotypizačních informací (Haas et al., 2013).



Byly provedeny dvě analýzy. Pro kombinaci sedmi tzv. *core loci* při obou hypotézách bylo LR vypočítáno jako >200:1, přičemž následná analýza sedmnácti tzv. *Yfiler* lokusů tuto šanci snížila na 20:1, že se jedná o ostatky Jörga Jenatsche<sup>18</sup>.

#### 7.4 Rekonstrukce rodokmenu v údolí Val Borbera

Rekonstrukce rozsáhlého rodokmenu v geograficky izolovaném údolí Val Borbera v severní Itálii je jedním z příkladů propojení analýzy DNA a negenetických záznamů o dané populaci. V tomto údolí v době analýzy žilo 1803 obyvatel, přičemž podle analýzy 89 % obyvatel náleželo do jednoho genealogického stromu, čítajícího více než 50 000 osob z 16 generací (Traglia et al., 2009). Rekonstrukce rodokmenu byla provedena pomocí písemných záznamů v matrikách a pomocí analýzy DNA u 1664 lidí za použití programu GeneAble a algoritmu Kinlnbcoef (Milani et al., 2011). Součástí této studie bylo i sledování vývoje migrace populace v dané oblasti, procento endogamních sňatků<sup>19</sup> a genetická studie zaměřená na polygenně podmíněné choroby.

#### 7.5 Rekonstrukce rodokmenu Řádu Amišů v Pensylvánii, USA

Zřejmě nejčastěji studovanou skupinou lidí v oblasti medicínské genetiky, dědičnosti a genealogie jsou Amišové<sup>20</sup>. V roce 1988 byla vytvořena elektronická genealogická databáze AGDB (Amish genealogy database) podle knihy Fisher Family History, zaznamenávající kompletní genealogii Amišů od jejich zakladatelů z 18. století. Na základě AGDB byl pomocí softwaru PedHunter vygenerován obsáhlý rodokmen této konkrétní skupiny Amišů (Agarwala et al., 1998). Ten obsahuje 16 prvotních zakladatelů (11 žen a 5 mužů), kteří byli z více než poloviny předky úzké skupiny Amišů čítající 128 osob. Tato skupina dala vzniknout všem dnes žijícím Amišům v Pensylvánii (Lee et al., 2010).

#### 7.6 Rekonstrukce rodokmenu 18. dynastie faraónů (1550-1295 př. l.)

V roce 2007 započala detailní radiologická, genetická a antropologická studie 11 mumií z konce 18. dynastie egyptských faraónů za účelem potvrzení či určení identity některých z nich. Tento projekt byl nazván „Projekt rodiny krále Tutanchamona“. Hlavními testovanými byla mumie krále Tutanchamona a jeho pěti přímých předků až k pra-prarodičům. Z každé testované mumie byly odebrány 2-4 vzorky DNA podle metodiky Richarda a Sykese (1995) a společně s negativními kontrolními vzorky byla provedena PCR reakce zaměřená na lokusy: 16 STR markerů na Y-chromozomu a 8 STR markerů na autozomální DNA. Společně s lidskou DNA byla sledována i přítomnost specifických sekvencí *Plasmodium falciparum*, prvoka způsobujícího malárii.

Markery DYS393 a Y-GATA-H4 měly stejnou alelickou kombinaci u všech tří královských mumií mužské linie – Amenhotepa III., KV55 a Tutanchamona. Na základě tohoto zjištění byla potvrzena původní teorie o jejich pokrevní příbuznosti. 8 autozomálních markerů bylo sledováno u 7 z 11 mumií -

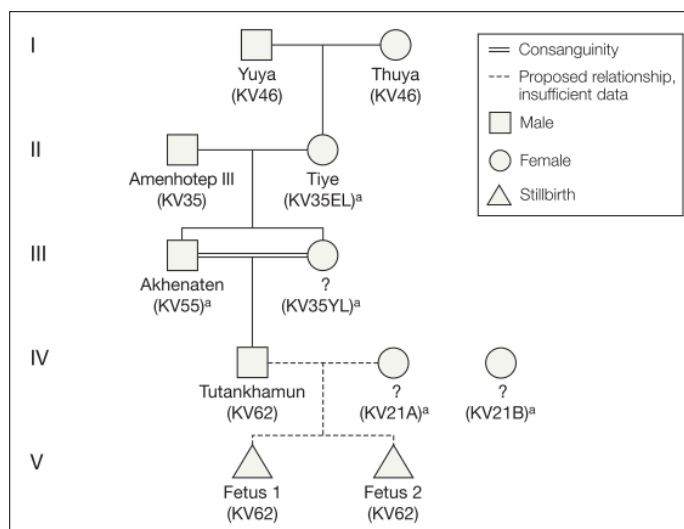
<sup>18</sup> Konkrétní výpočty včetně mutační frekvence jsou podrobně uvedeny v článku Haas et al. (2013).

<sup>19</sup> Endogamní svazek – manželství mezi příbuznými osobami.

<sup>20</sup> Amišové neboli Amenité jsou skupinou lidí převážně žijící na území USA a Kanady, kteří žijí striktně náboženským životem, odmítají techniku i válku. Typické jsou pro ně plnovousy a strohé ošacení.

Thuya, Yuya, Amenhotep III, Tutanchamon, KV55 a dvě neznámé mumie z hrobky KV35. Pro zbylé čtyři mumie (mumie plodů z hrobky KV62 a mumie KV21A a KV21B) nebylo možné určit kompletní genotyp 8 STR markerů na autozomech, a proto je jejich totožnost spekulativní (rodokmen viz obrázek č. 3), (Hawass et al., 2010).

Přítomnost specifických sekvencí *Plasmodium falciparum* byla potvrzena u 4 testovaných mumii včetně mumie Tutanchamona. Tutanchamon podle všeho trpěl Köchlerovou chrobou typu II., zánětlivým onemocněním kloubů, a v kombinaci s malárií a frakturou levé nohy se mohlo jednat o příčinu jeho brzkého úmrtí ve věku 19 let (Hawass et al., 2010).



Obrázek č. 3, Rodokmen faraonů pozdní 18. dynastie (Hawass et al., 2010)

## 7.7 Král Richard III. a jeho kontroverzní hrob

Král Richard III. byl anglickým králem od roku 1483 do roku 1485, kdy byl v bitvě u Bosworthu zabit. Jeho domnělé ostatky byly nalezeny v srpnu 2012 v blízkosti katedrály v Leicesteru, Anglie. První oficiální vyjádření, že se s největší pravděpodobností jedná o pozůstatky krále Richarda III., se konalo v únoru 2013. Testování identity prostřednictvím mtDNA bylo založeno na srovnání se vzorkem Michaela Ibsena, žijícího muže, který by podle genealogických záznamů měl být s Richardem III. příbuzný v maternální linii. Dalšími důkazními materiály byla osteologická studie provedená na kostře, která podle historických záznamů měla nést známky vrozeného poškození páteře a ruky. Ačkoli byla na kostře potvrzena silná skolióza, defekt ruky nalezen nebyl (mohlo se jednat o pouhý mýtus). Přes všechny tyto uveřejněné nálezy nebyla doposud publikována žádná odborná studie popisující přesný postup analýzy mtDNA, jakožto ani frekvenční data či výpočty LR pro konkrétní hypotézy. Jediným oficiálním zdrojem jsou webové stránky Univerzity v Leicesteru, ale ty svým obsahem nepokrývají celou problematiku; vyvstává tedy otázka, jak silné úrovně identifikace bylo dosaženo a zda by nalezené

ostatky nemohly náležet osobě pokrevně příbuzné, a nikoli přímo Richardovi III. Nicméně aktuálním stanoviskem Univerzity v Leicesteru je, že se jedná o ostatky Richarda III osobně.<sup>21</sup>

## 7.8 Určení ostatků obětí teroristického útoku z 11. 9. 2001, New York

Teroristický útok 11. 9. 2001 na Světové obchodní centrum v New Yorku byl jedním z nejrozsáhlejších úkolů pro forenzní genetiky za poslední dvě desetiletí. S postupem času bylo uveřejněno, že celkový počet obětí se přiblížil 3000 (konkrétní čísla se liší podle udávaných zdrojů, např. podle Leclaire et al. (2007) se jednalo o 2749 osob) a přibližně 15000 částí lidských těl, které bylo potřeba přiřadit ke konkrétní osobě.

Pro každý vzorek byly vzneseny čtyři hypotézy – vzorek patří oběti X a vzorek patří osobě nepříbuzné X; tyto dva vzorky pochází od jedné osoby a tyto dva vzorky pochází od dvou nepříbuzných osob. Apriorní šance byla vypočítána jako 1/počet obětí, a následně se vypočítávaly jednotlivé hodnoty LR. Vzorky, které sloužily pro identifikaci, pocházely nejčastěji od příbuzných 1. stupně, popř. byl do databáze zahrnut i profil pohřešovaného (stěr ze zubního kartáčku či vlasy).

Tento případ masivního určování profilů osob na základě blízkých příbuzných poukázal hned na několik problémů – příbuznost mezi oběťmi, nemožnost přesně určit počet obětí a omezení vyplývající z použití profilů nekompletních z důvodu vysoké degradace (Brenner a Weir, 2003; Leclair et al., 2007).

## 8 Závěr

Určování vzdálenější příbuznosti osob, stejně jako identifikace neznámých ostatků, jsou obvykle komplexní úkoly, vyžadující multidisciplinární přístup nejen v rámci biologických disciplín, ale často v mnohem širším kontextu. Formální vztahy mezi osobami jsou přitom sice cenným, ale ne vždy úplně věrohodným zdrojem informací o daném rodokmenu. Některé starší metody identifikace osob, jako kupříkladu hledání shody morfologických znaků na kostře či identifikace založená na krevních skupinách, byly doplněny a v řadě situací plně nahrazeny metodou analýzy DNA, která je jednou z nejpřesnějších současných metod určování biologických příbuzenských vztahů a identifikace osob.

Genetická informace je díky svým vlastnostem (vzorce předávání z rodičů na potomky, přítomnost v téměř každé buňce těla<sup>22</sup>, neměnnost daná replikací DNA založenou na komplementaritě bazí, poměrně ustálené frekvence mutací atd.) velmi vhodným objektem. Metody identifikační analýzy DNA se od počátku 90. let minulého století stále rozvíjejí a původně používané postupy, založené na stanovení velikosti restrikčních fragmentů DNA, byly nahrazeny metodami analýzy STR (short tandem repeats) markerů, přičemž i ty jsou postupně nahrazovány ještě pokročilejšími metodami, mezi nimiž je třeba zmínit zejména nástup technik celogenomového sekvenování. Jeho přínos k identifikaci a určování příbuznosti lze srovnat s jiným přelomovým objevem, a to technikou PCR, která umožnila amplifikovat

<sup>21</sup> Oficiální stránky Univerzity v Leicesteru věnované Richardovi III. <http://www.le.ac.uk/richardiii/index.html>.

<sup>22</sup> Výjimku tvoří např. zralé erytrocyty.

specifické segmenty DNA, a tak provádět analýzu i u vzorků s malým obsahem DNA či vzorků degradovaných.

Interpretace výsledků forenzní analýzy DNA je založena na pravděpodobnostní analýze, a to na bayesovské inferenční logice kombinované s Hardy-Weinbergovým zákonem, popisujícím frekvenci alel v rovnovážné populaci. I když je bayesiánská statistika používaná při evaluaci jednotlivých příbuzenských hypotéz z části ovlivnitelná subjektivním pohledem experta, je zřejmě nejfundovanějším nástrojem k odhadu pravděpodobnosti těchto hypotéz ve světle všech důkazů. Základním předpokladem analýzy je postulate testovaných hypotéz, pro něž poté stanovujeme hodnotu LR. To lze následně kombinovat s apriorní šancí, a odhadnout tak celkovou šanci či pravděpodobnost námi postulovaných hypotéz ve světle všech vědeckých i nevědeckých důkazů. Případ carské rodiny Romanovců a jiné kazuistiky důkazem, že potvrdit identitu osob či alespoň učít nejpravděpodobnější příbuzenské vztahy lze při dnešních technikách i rozbořením velmi staré DNA. Nasazení forenzní genetiky při identifikaci obětí hromadných neštěstí, jako byl útok na budovy WTC z 11. 9. 2001 v New Yorku, naproti tomu ukázalo, že přestože je analýza DNA na vysoké úrovni, v takovémto objemu dat a při problematickém stavu vzorků neumožňuje ani dnes vždy jednoznačně určit všechny oběti.

Praxe tak ukazuje, že identifikace ani určení příbuznosti nemusí být vždy jednoduchý úkol, neboť může být komplikován celou řadou faktorů, jako je stav analyzovaných vzorků, potenciál použité analýzy, spolehlivost (chybovost) této analýzy, neúplná či nepřesná data z informačních zdrojů, jako jsou matriky apod.

Pro člověka jako sociálně ukotvenou entitu bylo vždy důležité znát svůj původ, historii svého rodu, a mít tak možnost zařadit se do konkrétní skupiny. Moderní věda, konkrétněji forenzní genetika, je schopná na základě vzorku DNA nejenom učít identitu osoby, ale zařadit ji do širšího kontextu rodiny, rodu či populace. Výrazně rozvíjející se analýza SNP markerů a WGA jsou metody, které do budoucna mohou přinést nové poznatky nejen o identifikaci osob, ale zároveň jsou metodami, které s největší pravděpodobností budou schopné určit fenotypové znaky z genetického kódu, a rozšířit tak potenciál forenzně genetické analýzy dalším směrem.

Poznatky získané při zpracovávání této práce ukazují, že DNA analýza není pouze nástroj vhodný pro kriminalistické pátrání, ale její využití široce přesahuje rámec soudních procesů a je dnes jedním z hlavních zdrojů informací pro genealogy, historiky a antropology.

## 9 Seznam literatury

- Agarwala, R., Biesecker, L., Hopkins, K., Francomano, C., Schaffer, A., (1998). Software for constructing and verifying pedigrees within large genealogies and an application to the old order amish of lancaster county. *Genome research*, 8(3), 211-221.
- Baner, J., Nilsson, M., Mendel-Hartvig, M., Landegren, U., (1998). Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic acids research*, 26(22), 5073-5078.
- Bayes, T., Price, R., (1763). An Essay towards solving a problem in the doctrine of chance. By the late rev. Mr. Bayes, communicated by Mr. Price, in a letter to John Canton, A. M. and F. R. S. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 53, 370–418.
- Bendall, K., Sykes, B., (1995). Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region. *American journal of human genetics*, 57(2), 248-256.
- Berger, B., Niederstätter, H., Erhart, D., Gassner, Ch., Schennach, H., Parson, W., (2013). High resolution mapping of Y haplogroup G in Tyrol (Austria). *Forensic science international: Genetics*, 7(5), 529-536.
- Bittles, A., Mason, W., Greene, J., Rao, A., (1991). Reproductive behavior and health in consanguineous marriages. *Science*, 252(5007), 789-794.
- Børsting, C., Morling, N., (2011). Mutations and/or close relatives? Six case work examples where 49 autosomal SNPs were used as supplementary markers. *Forensic science international: Genetics*, 5(3), 236-241.
- Børsting, C., Morling, N., (2011). Mutations and/or close relatives? Six case work examples where 49 autosomal SNPs were used as supplementary markers. *Forensic science international: Genetics*, 5(3), 236-241.
- Boselli, M., Rock, J., Ünal, E., Levine, S., Amon, A., (2009). Effect of age on meiosis in budding yeast. *Dev Cell*, 16(6), 844-855.
- Brenner, C., (1997). Symbolic kinship program. *Genetics*, 145(2), 535-542.
- Brenner, C., Weir, B., (2003). Issues and strategies in the DNA identification of World Trade Center victims. *Theoretical population biology*, 63(3), 173-178.
- Brenner, H. CH., (2003). Old family secrets exposed. *International Congress Series* 1239, 633–635.
- Brown, W. M., (1980). Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 77(6), 3605-3609.
- Buckleton, J., Triggs, Ch., Walsh, S., (2005). *Forensic DNA evidence interpretation*. CRC Press, Boca Raton.
- Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, A., Eisenberg, A., Allen, R., (1991). Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *American journal of human genetics*, 48(1), 137-144.
- Budowle, B., Koons, B., Errera, J., (1996). Multiplex amplification and typing procedure for the loci D1S80 and amelogenin. *Journal of forensic science*, 41(4), 660-663.
- Butler, J. M., (2010). *Fundamentals of forensic DNA typing*. Elsevier.
- Cann, R. L., Brown, W., Wilson, A., (1982). Evolution of human mitochondrial DNA: a preliminary report. *Progress in clinical and biological research*, 103, 157-165.
- Coble, M., Loreille, O., Wadhams, M., Edson, S., Maynard, K., Meyer, C., Niederstätter, H., Berger, C., Berger, B., Falsetti, A., Gill, P., Parson, W., Finelli, L., (2009). Mystery solved: the identification of the two missing Romanov children using DNA analysis. *Plos One*, 4(3), 1-9.

- Deng, Y. J., Li, Y., Yu, X., Li, L., Wu, D., Zhou, J., Man, T., Yang, G., Yan, J., Cai, D., Wang, J., Yang, H., Li, S., Yu, J., (2005). Preliminary DNA identification for the tsunami victims in Thailand. *Genomics proteomics bioinformatics*, 3, 143-157.
- Dorsten, L., Hotchkiss, L., King, T., (1999). The effect of inbreeding on early childhood mortality: twelve generations of an Amish settlement. *Demography*, 36(2), 263-271.
- Drábek, J., (2009). Validation of software for calculating the likelihood ratio for parentage and kinship. *Forensic science international: Genetics*, 3(2), 112-118.
- Drábek, J., (2011). Interpretace DNA profilů při určování otcovství a příbuznosti. *Tribun EU*.
- Dubiley, S., Kirillov, E., Mirzabekov, A., (1999). Polymorphism analysis and gene detection by minisequencing on an array of gel-immobilized primers. *Nucleic acids research*, 27(18), 1-6.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H., Caskey, C., (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American journal of human genetics*, 49, 746-756.
- Elston, R. C., (1986). Probability and paternity testing. *American journal of human genetics*, 39, 112-122.
- Ermini, L., Olivieri, C., Rizzi, E., Corti, G., Bonnal, R., Soares, P., Luciani, S., Marota, I., De Bellis, G., Richards, M., Rollo, F., (2008). Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman. *Current biology*, 18(21), 1687-1693.
- Evet, I. W., Weir, B. S., (1998). Interpreting DNA evidence: Statistical genetics for forensic scientists. Sinauer Associates Inc.
- Evropská úmluva o adopci dětí (1967)
- Falik-Borenstein, T. C., (1994). Confined placental chimerism: Prenatal and postnatal cytogenetic and molecular analysis, and pregnancy outcome. *American Journal of Medical Genetics*, 50(1), 51-56.
- Foster, E., Jobling, M., Taylor, P., Donnelly, P., Knijff, P., Mieremet, R., Zerjal, T., Tyler-Smith, C., (1998). Jefferson fathered slave's last child. *Nature*, 396, 27-28.
- Francalacci, P., Morelli, L., Angius, A., Berutti, R., Reinier, F., Atzeni, R., Pili, R., Busonero, F., Maschio, A., Zara, I., Sanna, D., Useli, A., Urru, M., Marcelli, M., Cusano, R., Oppo, M., Zoledziewska, M., Pitzalis, M., Deidda, F., Porcu, E., Poddie, F., Kang, H., Lyons, R., Tarrier, B., Gresham, J., Li, B., Tofanelli, S., Alonso, S., Dei, M., Lai, S., Mulas, A., Whalen, M., Uzzau, S., Jones, Ch., Schlessinger, D., Abecasis, G., Sanna, S., Sidore, C., Cucca, F., (2013). Low-pass DNA sequencing of 1200 Sardinians reconstructs European Y-chromosome phylogeny. *Science*, 341(6145), 565-569.
- Gasbarra, D., Pirinen, M., Sillanpää, M., Arjas, E., (2007). Estimating genealogies from linked marker data: a Bayesian approach. *BMC bioinformatics*, 8, 1-31.
- Giammarco, E. (2011). Someone Else's Twin: The True Story of Babies Switched at Birth. Prometheus.
- Gill, P., Ivanov, P., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., Evett, I., Hagelberg, E., Sullivan, K., (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature genetics*, 6(2), 130-135.
- Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S., (2007). An introduction to forensic genetics. Wiley, Chichester, West Sussex.
- Griffin, D. K., Abruzzo, M., Millie, E., Sheean, L., Feingold, E., Sherman, S., Hassold, T., (1995). Non-disjunction in human sperm: Evidence for an effect of increasing paternal age. *Human Molecular Genetics*, 4 (12), 2227-2232.
- Griffin, T., Hall, J., Prudent, J., Smith, L., (1999). Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96(11), 6301-6306.
- Gusela, J. F., (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306(5940), 234-238.

- Haas, C., Papageorgopoulou, Ch., Shved, N., Ru, F., Purps, J., Geppert, M., Willuweit, S., Roewer, L., Krawczak, M., (2013). Y-chromosomal analysis identifies the skeletal remains of Swiss national hero Jörg Jenatsch (1596–1639). *Forensic science international: Genetics*, 7, 610-617.
- Handt, O., Richards, M., Trommsdorff, M., Kilger, C., Simanainen, J., Georgiev, O., Bauer, K., Stone, A., Hedges, R., Schaffner, W., (1994). Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science*, 264(5166), 1775-1778.
- Hardy, G. H., (1908). Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, 28, 49-50.
- Hawass, Z., Gad, Y., Ismail, S., Khairat, R., Fathalla, D., Hasan, N., Ahmed, A., Elleithy, H., Ball, M., Gaballah, F., Wasef, S., Fateen, M., Amer, H., Gostner, P., Selim, A., Zink, A., Pusch, C., (2010). Ancestry and pathology in king Tutankhamun's family. *Journal of American Medical Association*, 303(7), 639-647.
- Hodgkinson, A., Eyre-Walker, A., (2010). Human triallelic sites: evidence for a new mutational mechanism? *Genetics*, 184, 233-241.
- Holland, M., Parson, W., (2011). GeneMarker® HID: A reliable software tool for the analysis of forensic STR data. *Journal of forensic science*, 56(1), 29-35.
- Holliday, R., Grigg, G., (1993). DNA methylation and mutation. *Mutation research*, 285, 61-67.
- Howell, M. W., Jobs, M., Gyllenstein, U., Brookes, A., (1999). Dynamic allele-specific hybridization. *Nature*, 17, 87-88.
- \*Hummel, K., Schmidt, V. (1969). Cit dle Drábek, J., (2011). Interpretace DNA profilů při určování otcovství a příbuznosti. *Tribun EU*.
- Chen, X., Kwok, P., (1997). Template-directed dye-terminator incorporation (TDI) assay: A homogeneous DNA diagnostic method based on fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic acids research*, 25(2), 347-353.
- Chen, X., Levine, L., Kwok, P., (1999). Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis. *Genome research*, 9(5), 492-498.
- Chen, X., Livak, K., Kwok, P., (1998). A homogeneous, ligase-mediated DNA diagnostic test. *Genome research*, 8(5), 549-556.
- Chen, X., Zehnbaauer, B., Gnirke, A., Kwok, P., (1997). Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(20), 10756-10761.
- Ibarra, A., Martinez, M., Freire-Aradas, A., Fondevila, M., Carracedo, A., Porras, L., Gusmao, L., (2013). Using STR, MiniSTR and SNP markers to solve complex cases of kinship analysis. *Forensic science international*, 4(1), 91-92.
- Ivanov, P., Wadhams, M., Roby, R., Holland, M., Weedn, V., Parsons, T., (1996). Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nature genetics*, 12(4), 417-420.
- Jakovski, Z., Jankova, R., Biol, K., Spasevska, L., Jovanovic, R., Janeska, B., (2011). Forensic DNA expertise of incest in early period of pregnancy. *Journal of forensic and legal medicine*, 18(1), 34-37.
- Jeffreys, J. A., (1979). DNA sequence variants in the  $\gamma$ -,  $\alpha$ -,  $\delta$ - and  $\beta$ -globin genes of man. *Cell*, 18, 1-10.
- Jeffreys, J. A., Wilson, V., Neumann, R., Keyte, J., (1988). Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: Towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic acids research*, 16, 10953-10971.
- Jeffreys, J. A., Wilson, V., Thein, S., (1985). Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314(7), 67-73.

- Jones, K., Smith, D., Harvey, M., Hall, B., Quan, L., (1975). Older paternal age and fresh gene mutation: data on additional disorders. *The Journal of pediatrics*, 86(1), 84-88.
- Kaiser, M., Lyamicheva, N., Ma, W., Miller, C., Neri, B., Fors, L., Lyamichev, V., (1999). A comparison of eubacterial and archaeal structure-specific 5'exonucleases. *The Journal of biological chemistry*, 274(30), 21387-21394.
- Kayser, M., Roewer, L., Hedman, M., Henke, L., Henke, J., Brauer, S., Krüger, C., Krawczak, M., Nagy, M., Dobosz, T., Szibor, R., Knijff, P., Stoneking, M., Sajantila, A., (2000). Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *American journal of human genetics*, 66(5), 1580-1588.
- Kayser, M., Vermeulen, M., Knoblauch, H., Schuster, H., Krawczak, M., Roewer, L., (2007). Relating two deep-rooted pedigrees from Central Germany by high-resolution Y-STR haplotyping. *Forensic science international: Genetics*, 1(2), 125-128.
- Keller, A., Graefen, A., Ball, M., Matzas, M., Boisguerin, V., Maixner, F., Leidinger, P., Backes, Ch., Khairat, R., Forster, M., Stade, B., Franke, A., Mayer, J., Spangler, J., McLaughlin, S., Shah, M., Lee, C., Harkins, T., Sartori, A., Moreno-Estrada, A., Henn, B., Sikora, M., Semino, O., Chiaroni, J., Rootsi, S., Myres, N., Cabrera, V., Underhill, P., Bustamante, C., Vigl, E., Samadelli, M., Cipollini, G., Haas, J., Katus, H., O'Connor, B., Carlson, M., Meder, B., Blin, N., Meese, E., Pusch, C., Zink, A., (2012). New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. *Nature communications*, 3(698), 1-9.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H., (1971). Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of molecular biology*, 56(2), 341-361.
- Kloosterman, A., Budowle, B., Daselaar, P., (1993). PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus. *International journal of legal medicine*, 105, 257-264.
- Konovalov, D., Manning, C., Henshaw, M., (2004). Kingroup: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular ecology notes*, 4, 779-782.
- Kostrikis, L. G., Tyagi, S., Mhlanga, M., Ho, D., Kramer, F., (1998). Spectral genotyping of human alleles. *Science*, 279, 1228-1229.
- Kyriazopoulou-Panagiotopoulou, S., Kashef Haghighi, D., Aerni, S., Sundquist, A., Bercovici, S., Batzoglou, S., (2011). Reconstruction of genealogical relationships with applications to Phase III of HapMap. *Bioinformatics*, 27(13), 333-341.
- Leclair, B., Shaler, R., Carmody, G., Eliason, K., Hendrickson, B., Judkins, T., Norton, M., Sears, Ch., Scholl, T., (2007). Bioinformatics and human identification in mass fatality incidents: the World Trade Center disaster. *Journal of forensic science*, 52(4), 806-819.
- Lee, W., Pollin, T., O'Connell, J., Agarwala, R., Schäffer, A., Lee, (2010). PedHunter 2.0 and its usage to characterize the founder structure of the Old Order Amish of Lancaster County. *BMC medical genetics*, 11, 1-13.
- Leutenegger, A., Prum, B., Génin, E., Verny, Ch., Lemainque, A., Clerget-Darpoux, F., Thompson, E., (2003). Estimation of the inbreeding coefficient through use of genomic data. *American journal of human genetics*, 73(3), 516-523.
- Li, Ch., Zhang, S., Que, T., Li, L., Zhao, S., (2011). Identical but not the same: The value of DNA methylation profiling in forensic discrimination within monozygotic twins. *Forensic science international*, 3(1), 337-338.
- Livak, K., (1999). Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genetic analysis: biomolecular engineering*, 14(5-6), 143-149.
- Lizardi, P., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D., Ward, D., (1998). Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature genetics*, 19(3), 225-232.



- Lutonský, B., (2003). Lexikon genealoga. Praha.
- Marchington, D., Macaulay, V., Hartshorne, G., Barlow, D., Poulton, J., (1998). Evidence from human oocytes for a genetic bottleneck in an mtDNA disease. *American journal of human genetics*, 63(3), 769-775.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L., Pemberton, J., (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639-655.
- McEvoy, B., Bradley, D. G., (2006), Y-chromosomes and the extent of patrilineal ancestry in Irish surnames. *Human Genetics*, 119, 212–219.
- McEvoy, B., Bradley, D., (2006). Y-chromosomes and the extent of patrilineal ancestry in Irish surnames. *Human genetics*, 119 (1-2), 212-219.
- Mendez, F., Krahn, T., Schrack, B., Krahn, A., Veeramah, K., Woerner, A., Fomine, F., Bradman, N., Thomas, M., Karafet, T., Hammer, M., (2013). An African American paternal lineage adds an extremely ancient root to the human Y chromosome phylogenetic tree. *American journal of human genetics*, 92(3), 454-459.
- Merriman, C. (1924). The intellectual resemblance of twins. *Psychological Monographs*, 33(5), 57.
- Milani, G., Masciullo, C., Sala, C., Bellazzi, R., Buetti, I., Pistis, G., Traglia, M., Toniolo, D., Larizza, C., (2011). Computer-based genealogy reconstruction in founder populations. *Journal of biomedical informatics*, 44(6), 997-1003.
- Ministerstvo spravedlnosti ČR (2011). Statistický přehled soudních agend, druhá část.
- Moreau, C., Vézina, H., Yotova, V., Hamon, R., Knijff, P., Sinnett, D., Labuda, D., (2009). Genetic heterogeneity in regional populations of Quebec. Parental lineages in the Gaspé Peninsula. *American journal of physical anthropology*, 139 (4), 512-522.
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., White, R., (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235(4796), 1616-1622.
- Olivier, M., (2009). The Invader assay for SNP genotyping. *Mutant research*, 573(1-2), 103-110.
- Parsons, T., Bales, R., (1955). Family, socialization and interaction process. Glencoe: Free Press.
- Pastinen, T., Kurg, A., Metspalu, A., Peltonen, L., Syvänen, A., (1997). Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome research*, 7(6), 606-614.
- Pastinen, T., Raitio, M., Lindroos, K., Tainola, P., Peltonen, L., Syvänen, A., (2000). A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome research*, 10(7), 1031-1042.
- Phillips, C., Salas, A., Sanchez, J., Fondevila, M., Gomez-Taco, A., Alvarez-Dios, J., Calaza, M., Casares de Cal, M., Ballard, D., Lareu, M., Carracedo A., (2007). Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. *Forensic science international: Genetics*, 1, 273-280.
- Piccinini, A., Coco, S., Parson, W., Cattaneo, C., Gaudio, D., Barbazza, R., Galassi, A., (2010). World War One Italian and Austrian soldier identification project: DNA results of the first case. *Forensic science international: Genetics*, 4(5), 329-333.
- Rampim, G. F., Bellintani, E., Freitas, V., Gerbase-DeLima, M., (2007). Tetragametic chimerism identified during routine histocompatibility testing. *Human Immunology*, 68(1), 129.
- Riester, M., Stadler, P., Klemm, K., (2009). FRANz: reconstruction of wild multi-generation pedigrees. *Bioinformatics*, 25(16), 2134-3139.
- Richards, M., Sykes, B., (1995). Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains. *Journal of archaeological science*, 22(2), 291-299.

- Rinkevich, A. (2001). Human natural chimerism: An acquired character or a vestige of evolution? *Human Immunology*, 62(6), 651–657.
- Rogaev, E., Grigorenko, A., Moliaka, Y., Faskhutdinova, G., Goltsov, A., Lahti, A., Hildebrandt, C., Kittler, E., Morozova, I., (2009). Genomic identification in the historical case of the Nicholas II royal family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 106(13), 5258-5263.
- Ronaghi, M., (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research*, 11(1), 3-11.
- Ross, P., Hall, L., Smirnov, I., Haff, L., (1998). High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nature biotechnology*, 16(13), 1347-1351.
- Saiki, R. K., Walsh, S., Levenson, C., Erlich, H., (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 86(16), 6230-6234.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H., (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-91.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., Arnheim, N., (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Sanger, F., Coulson, A. R., (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94, 441-448.
- Scott, J., Treas, J., Richards, M., (2007). *The Blackwell companion to the sociology of families*. Blackwell.
- Shumaker, J., Metspalu, A., Caskey, C., (1996). Mutation detection by solid phase primer extension. *Human station*, 7(4), 346-354.
- Schwartz, M., Vissing, J., (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine*, 347(8), 576-580.
- Soares, P., (2009). Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *American journal of human genetics*, 84, 740-759.
- Southern, E. M., (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98, 503-517.
- Stone, C., Starrs, J., Stoneking, M., (2001). Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *Journal of forensic sciences*, 46 (1), 173-176.
- Szibor, R., Krawczak, M., Hering, S., Edelmann, J., Kuhlisch, E., Krause, D., (2003). Use of X-linked markers for forensic purposes. *International journal of legal medicine*, 117, 67-74.
- Šimková, H., (2012). *Breviář forenzní genetiky*, Tribun EU.
- Tautz D., Renz M., (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.*, 12(10), 4127-4138.
- Thompson, E.A, (1976). Inference of genealogical structure. *Social science information*, 15, 477-526.
- Tillmar, O. A., Egeland, T., Lindblom, B., Holmlund, G., Mostad, P., (2011). Using X-chromosomal markers in relationship testing: Calculation of likelihood ratios taking both linkage and linkage disequilibrium into account. *Forensic science international: Genetics*, 5, 506-511.
- Traglia, M., Sala, C., Masciullo, C., Cverhova, V., Lori, F., Pistis, G., Bione, S., Gasparini, P., Ulivi, S., Ciullo, M., Natile, T., Bosi, E., Sirtori, M., Mignogna, G., Rubinacci, A., Buetti, I., Camaschella, C., Petretto, E., Toniolo, D., (2009). Heritability and demographic analyses in the large isolated population of Val Borbera suggest advantages in mapping complex traits genes. *Plos One*, 4(10), 1-10.

Tyagi, S., Bratu, D., Kramer, F., (1998). Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature biotechnology*, 16, 49-53.

Úmluva o ochraně dětí a spolupráci při mezinárodním osvojení (1993)

Úmluva Organizace spojených národů o právech dítěte (1989)

Výroční zpráva IVF ÚPMD (2013)

Wang, D., Fan, J., Siao, Ch., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbel, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, Ch., Rozen, S., Hudson, T., Lipshutz, R., Chee, M., Lander, E., (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280, 1077-1082.

Weinberg, W., (1908). Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahreshefte des Vereins Varterländische Naturkdunde in Württemberg*, 64, 369-382.

Wenk, R. E., Traver, M., Chifari, F., (1996). Determination of sibship in any two persons. *Transfusion*, 36, 259-262.

Willuweit, S., Roewer, L., (2007). Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update. *Forensic science international: Genetics*, 1, 83–87.

Wright, S., (1922). Coefficients of inbreeding and relationship. *The American naturalist*, 56(645), 330-338.

Zákon č. 359/1999 Sb.

Zákon č. 40/1964 Sb.

Zákon č. 94/1963 Sb.

Zhivotovski, L., (1999). Recognition of the remains of Tsar Nicholas II and his family: a case of premature identification? *Annals of human biology*, 26(6), 569-577.

## Internetové zdroje

Imperial Household Agency, (2011). <http://www.kunaicho.go.jp/e-about/genealogy/img/keizu-e.pdf>

<http://www.fertimed.cz/metody-asistovane-reprodukce/>

<http://www.genebase.cz/.html>



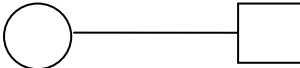


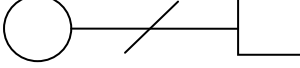


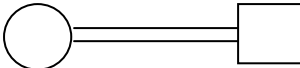

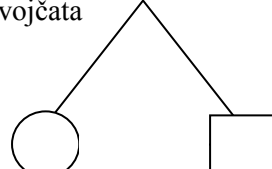

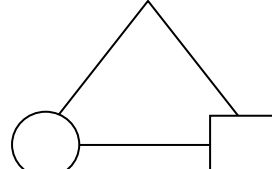

<http://www.cstl.nist.gov/strbase/mutation.htm>

<http://www.le.ac.uk/richardiii/index.html>

\* Označení sekundární citace

## 10 Příloha

Příloha č. 1, Mezinárodně uznávané značky v rodokmenu

| Mezinárodně uznávané značky v rodokmenu  |   |   |                      |  |
|--|---|---|----------------------|--|
| Žena   |    |  | Sňatek               |    |
| Muž  |    |  | Rozvod               |    |
| Jedinec neurčeného pohlaví   |    |  | Příbuzenský sňatek   |    |
| Úmrtí  |    |   | Dizygotní dvojčata   |   |
| Potrat   |  |   | Monozygotní dvojčata |  |
| Sourozenci   |  |   |                      |  |
| ● Černá značka značí přenašeče, celý symbol vybarvený značí postiženého daným znakem |   |   |                      |  |

Příloha č. 2, Slovní vyjádření odpovídající procentuální aposteriorní pravděpodobnosti při  $Pr = 0,5$  dle Hummela (1969)

| Apsteriorní pravděpodobnost při $Pr = 0,5$ | PI            | Slovní vyjádření dle Hummela        |
|--|---------------|-------------------------------------|
| 70,00% - 79,00%                            | 2,33 – 3,76   | pouze formálně svědčí pro otcovství |
| 80,00% - 89,00%                            | 4,00 – 8,09   | náznak otcovství                    |
| 90,00% - 94,90%                            | 9,00 – 18,61  | otcovství pravděpodobné             |
| 95,00% - 98,90%                            | 19,00 – 89,9  | otcovství velmi pravděpodobné       |
| 99,00% - 99,74%                            | 99,00 – 383,6 | otcovství vysoce pravděpodobné      |
| 99,75%-                                    | >399          | otcovství prakticky prokázáno       |

(Drábek, 2011)

Příloha č. 3, Předpokládaná shoda alel u příbuzných osob a koeficienty příbuznosti  $k$

| Vztah                  | Žádná společná alela         | Jedna společná alela          | Dvě společné alely           |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Rodič-dítě             | 0 ( $k_0=0$ )                | 1 ( $2k_1=1$ )                | 0 ( $k_2=0$ )                |
| Sourozenci (úplní)     | $\frac{1}{4}$ ( $k_0=0,25$ ) | $\frac{1}{2}$ ( $2k_1=0,5$ )  | $\frac{1}{4}$ ( $k_2=0,25$ ) |
| Sourozenci (poloviční) | $\frac{1}{2}$ ( $k_0=0,5$ )  | $\frac{1}{2}$ ( $2k_1=0,5$ )  | 0 ( $k_2=0$ )                |
| Bratřenci a sestřenice | $\frac{3}{4}$ ( $k_0=0,75$ ) | $\frac{1}{4}$ ( $2k_1=0,25$ ) | 0 ( $k_2=0$ )                |
| Strýc-synovec          | $\frac{1}{2}$ ( $k_0=0,5$ )  | $\frac{1}{2}$ ( $2k_1=0,5$ )  | 0 ( $k_2=0$ )                |
| Teta-neteř             | $\frac{1}{2}$ ( $k_0=0,5$ )  | $\frac{1}{2}$ ( $2k_1=0,5$ )  | 0 ( $k_2=0$ )                |
| Prarodič-vnouče        | $\frac{1}{2}$ ( $k_0=0,5$ )  | $\frac{1}{2}$ ( $2k_1=0,5$ )  | 0 ( $k_2=0$ )                |

(Drábek, 2011)